

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudios estructurales en la histona H1 de ceratitis capitata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Luis Barbero Esteban**

DIRECTOR:

**Francisco Montero Carnerero**

**Madrid, 2015**

José Luis Barbero Esteban

TP  
1982  
127



X-53-00011-5

ESTUDIOS ESTRUCTURALES EN LA HISTONA H<sub>1</sub> DE CERATITIS CAPITATA

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1982



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 127/82

© José Luis Barbero Esteban  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-16191-1982

AUTOR: JOSE LUIS BARBERO ESTEBAN

ESTUDIOS ESTRUCTURALES EN LA HISTONA H1 DE  
CERATITIS CAPITATA

DIRECTOR: Dr. D. Francisco Montero Carnerero,  
Profesor Adjunto del Departamento de  
Bioquímica de la Facultad de Ciencias  
Químicas de la Universidad Compluten  
se de Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Bioquímica

1981



Esta investigación se ha desarrollado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, bajo la dirección del Prof. D. Francisco Montero Carnerero y del Prof. D. Luis Franco Vera, a quienes de seo expresar mi agradecimiento por su constante apoyo y ayuda.

Agradezco igualmente al Prof. D. Angel Martín Municio, Catedrático-Director del Departamento de Bioquímica, por el gran interés demostrado por la realización de este trabajo.

Asimismo, deseo expresar mi reconocimiento a mis compañeros de equipo, Dr. Ricardo Belmonte, José Luis Castro, Dra. Blanca Fernández, Gonzalo González, Dra. Consuelo Jimenez, Dr. Isidoro López, Gabriel Márquez, Federico Morán, R. María Nieto-Sandoval, Dr. Julián Perera y a todos aquellos que de alguna manera han contribuido a la realización del presente trabajo.



A Eutiquio y María  
A M. Carmen





A B R E V I A T U R A S

CNBr	Bromuro de cianógeno
GuCl	Cloruro de Guanidinio
PMSF	Fluoruro de p-metil-fenil-sulfonilo
PCA	Acido perclórico
PRT	Péptido resistente a la digestión tríptica controlada
PG <sub>CNB</sub>	Péptido de mayor tamaño molecular obtenido por hidrólisis con CNBr de H1 de <i>Ceratititis capitata</i>
PG <sub>CNB</sub> -PRT	Péptido de mayor tamaño molecular obtenido por hidrólisis con CNBr del PRT de <i>Ceratititis capitata</i>
PP <sub>CNB</sub>	Péptido de menor tamaño molecular obtenido por igual tratamiento de H1 de <i>Ceratititis capitata</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
NBS	N-Bromosuccinimida



## **INDICE**

	<u>Pag.</u>
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Estructura de la cromatina.....	2
1.2. Estudios de estructura primaria de las histonas muy ricas en lisina H1 y H5.....	7
1.3. Estudios de estructura secundaria y terciaria de las histonas muy ricas en lisina H1 y H5.....	16
1.4. H1 y estructura de cromatina.....	22
1.4.1. H1 y el primer y segundo nivel estructural.....	22
1.4.1.1. El cromatosoma.....	22
1.4.1.2. H1 y las superestructuras inducidas por sal en la cromatina.....	23
1.4.1.3. Localización de la histona H1 en la cromatina...	25
1.4.2. H1 y niveles superiores de organización.....	28
1.5. Dirección de la investigación realizada.....	31
2. MATERIALES Y METODOS.....	33
2.1. Preparación de los materiales biológicos.....	34
2.2. Aislamiento y purificación de las histonas H1...	34
2.2.1. Preparación de la cromatina.....	34
2.2.2. Extracción selectiva de la histona H1.....	35
2.2.3. Purificación cromatográfica de las histonas H1..	36
2.3. Técnicas analíticas.....	37
2.3.1. Electroforesis.....	37
2.3.2. Determinación de pesos moleculares.....	37
2.3.3. Análisis de aminoácidos.....	37
2.3.4. Determinación del residuo N-terminal.....	38
2.4. Hidrólisis química de las histonas H1.....	40
2.4.1. Tratamiento con CNBr de la histona H1 de <i>Ceratit-</i> <i>is capitata</i> .....	40
2.4.2. Separación de los productos resultantes del tra- tamiento con CNBr en H1 y PRT de <i>Ceratit</i> <i>is capitata</i> .....	40
2.4.3. Tratamiento con NBS de las histonas H1 de timo de ternera y <i>Ceratit</i> <i>is capitata</i> .....	41

-VI-

2.4.4.	Separación de los productos resultantes del tratamiento con NBS de las histonas H1.....	42
2.5.	Tratamientos proteolíticos.....	42
2.5.1.	Aislamiento y purificación de los péptidos resistentes a la digestión triptica.....	42
2.5.2.	Hidrólisis triptica.....	43
2.5.3.	Hidrólisis quimotriptica.....	44
2.5.4.	Hidrólisis con trombina.....	44
2.6.	Mapas tripticos.....	45
2.7.	Modificaciones covalentes.....	46
2.7.1.	Carboximetilación de H1 y PRT de <i>Ceratitidis capitata</i> .....	46
2.7.2.	Nitración.....	47
2.8.	Técnicas espectroscópicas.....	48
2.8.1.	Espectroscopía de absorción.....	48
2.8.2.	Dicroísmo circular.....	49
2.8.3.	Fluorescencia.....	50
2.9.	Secuencia automática.....	51
3.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	53
3.1.	Estructura primaria.....	54
3.1.1.	Aislamiento y purificación de los péptidos resistentes a la tripsina de las histonas H1 de timo de ternera y <i>Ceratitidis capitata</i> .....	55
3.1.2.	Tratamiento con CNBr de la histona H1 de <i>Ceratitidis capitata</i> .....	58
3.1.3.	Tratamiento con CNBr del PRT de <i>Ceratitidis capitata</i> .....	60
3.1.4.	Tratamiento con NBS de las histonas H1.....	63
3.1.5.	Degradación de H1 de <i>Ceratitidis capitata</i> con quimotripsina.....	69
3.1.6.	Degradación del PG <sub>CNB</sub> con tripsina.....	69
3.1.7.	Degradación comparativa de H1 de timo y <i>Ceratitidis</i> con trombina.....	70
3.1.8.	Determinación del residuo N-terminal.....	77
3.1.9.	Mapas tripticos.....	78

-VII-

3.1.10.	Secuencia parcial del PRT de <i>Ceratitidis capitata</i>	81
3.2.	Modificación covalente. Nitración.....	89
3.3.	Estudio de la estructura secundaria en las histonas H1 de <i>Ceratitidis capitata</i> , timo de ternera y sus respectivas regiones globulares.....	92
3.3.1.	Efecto del pH y la fuerza iónica.....	92
3.3.2.	Efecto del SDS.....	98
3.3.3.	Efecto de la nitración.....	102
3.3.4.	Influencia en la estructura secundaria de la pérdida de un fragmento N-terminal del PRT de <i>Ceratitidis capitata</i> .....	105
3.4.	Estudio de la estructura terciaria de las histonas H1 de timo de ternera y <i>Ceratitidis capitata</i> y de sus respectivas regiones globulares resistentes a la tripsina.....	108
3.4.1.	Influencia del pH y la fuerza iónica.....	109
3.4.1.1.	Estudios de absorción ultravioleta.....	110
3.4.1.2.	Estudios de dicroísmo circular en la región del UV próximo.....	115
3.4.1.3.	Titulación de los residuos de tirosina.....	120
3.4.1.4.	Estudios de espectrofluorimetría.....	130
3.4.2.	Influencia del SDS.....	136
3.4.2.1.	Espectroscopía de diferencia.....	136
3.4.2.2.	Dicroísmo circular en el UV próximo en presencia de SDS.....	138
3.4.2.3.	Efecto del SDS en la titulación de los residuos de tirosina de ambas histonas.....	143
3.4.2.4.	Estudios de espectrofluorimetría en presencia de SDS.....	146
3.4.3.	Estudios estructurales en el PG <sub>CNB</sub> -PRT.....	149
3.4.3.1.	Dicroísmo circular en la región del UV próximo del PG <sub>CNB</sub> -PRT.....	150
3.4.3.2.	Fluorescencia del PG <sub>CNB</sub> -PRT.....	152
3.4.4.	Influencia de la modificación covalente.....	154
3.4.4.1.	Titulación del residuo de tirosina no modificado en H1 de <i>Ceratitidis capitata</i> .....	154

-VIII-

3.4.4.2.	Influencia de la nitración sobre la estructura secundaria.....	156
3.4.4.3.	Dicroismo circular en el UV próximo de las histonas y sus PRTs modificados.....	158
3.5.	Modelo propuesto para la dinámica estructural de la histona H1 de <i>Ceratitidis capitata</i> y su región globular resistente a la tripsina.....	162
4.	CONCLUSIONES.....	166
5.	BIBLIOGRAFIA.....	171





## **1. INTRODUCCION**

### 1.1. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

Uno de los grandes problemas que se plantea la biología molecular en la actualidad es el modo de organización estructural del ácido desoxirribonucleico (DNA) en el núcleo de las células eucarióticas. Por otra parte, el DNA no puede considerarse como una molécula inerte y estática, sino que se duplica con extrema fidelidad y al menos una parte de él colabora en los procesos de síntesis del RNA, sirviendo de molde en un mecanismo regulado por un control complejo y cuidadoso. Así, mientras los diferentes tipos de células somáticas de un mismo organismo eucariótico poseen el mismo contenido en DNA celular, en cambio en cada una de ellas se expresan diferentes fragmentos de esta información total.

Desde hace bastante tiempo se sabe que el DNA se encuentra formando un complejo con diferentes proteínas y RNA dentro del núcleo celular en eucariontes, complejo que se ha denominado "cromatina". Esta cromatina puede ser aislada y purificada a distintos niveles como una entidad propia y por ello accesible a toda clase de experimentos "in vitro". La similitud en la relación proteínas/DNA existente entre la cromatina y los cromosomas aislados hace suponer que la cromatina tenga una determinada e importante significación "in vivo". La cromatina puede ser considerada a distintos niveles estructurales correspondientes a órdenes crecientes de organización y distintos niveles de funcionalidad.

Las proteínas cromosomales se agrupan en dos grandes clases principales; la primera de ellas contiene un conjunto de proteínas extraordinariamente básicas, presentes en el complejo en cantidades muy semejantes en peso al DNA y que han sido objeto de numerosos estudios, son las llamadas "histonas". Los restantes componentes proteicos de la cromatina se conocen en general con el nombre de "proteínas cromosomales no histonas" (PCNH), grupo mucho más heterogéneo, en el que se incluyen polimerasas y proteínas con otras actividades enzimáticas, así como proteínas con un posible papel estructural. Este grupo está mucho menos estudiado y tan

Tabla I Características de algunas proteínas cromosomales.

(1)	(2)	(3)	Fracción	Tamaño (n° de residuos)	Peso molecular (d)	% Lys (mol %)	% Arg (mol %)	$\frac{\% \text{ Lys}}{\% \text{ Arg}}$
<b>Histonas</b>								
H1	f1	I		213	21.000	27.7	1.4	19.78
H2B	f2b	IIb2		125	13.774	15.2	6.1	2.49
H2A	f2a2	IIb1		129	13.960	10.9	9.3	1.17
H3	f3	III		135	15.273	9.6	13.3	0.72
H4	f2a1	IV		102	11.236	10.8	13.7	0.79
H5	f2c	V		197	21.500	24.6	11.0	2.23
<b>Proteínas cromosomales no histonas</b>								
HMG-1					26.500	16.8	5.5	3.05
HMG-2					26.000	19.1	5.1	3.75
HMG-14						19.0	5.6	3.39
HMG-17			89		9.247	24.3	4.1	5.93
A-24					27.000	11.3	7.4	1.53
Ubiquitina			74		8.451	9.5	5.4	1.75

Las distintas nomenclaturas de las histonas están basadas en: (1) normas de "Ciba Foundation Symposium" (1974); (2) fraccionamiento químico; (3) fraccionamiento por cromatografía de cambio de ión.

solo se conocen datos importantes de un subgrupo de éstas que se ha denominado HMG (por su alta movilidad electroforética) y que poseen capacidad de interacción con algunas de las histonas.

El último de los componentes comentados, RNA, probablemente sea debido a la transcripción inmediata (RNA naciente) pero no se puede descartar la posibilidad de que una fracción de éste sea componente integral y necesario en el complejo de la cromatina.

Las proporciones relativas de estos componentes son variables dependiendo del órgano o tejido, incluso algunas veces en dependencia del método de preparación. Si bien la cantidad de histonas es normalmente equivalente en peso al DNA, la proporción es de PCNH y RNA varía entre amplios márgenes.

Los primeros estudios realizados sobre la cromatina se basaron en estudiar las características particulares de estas proteínas extraordinariamente básicas. Los primeros resultados alentadores para fraccionar este grupo de proteínas (Johns et al., 1962) y los siguientes estudios en este campo (Johns, 1967; Murray, 1964) llevaron a la dilucidación de algunas características importantes de este grupo de proteínas (ver Tabla I).

Hasta el año 1973, los estudios realizados sobre la estructura de la cromatina, utilizando fundamentalmente técnicas de difracción de rayos X (Wilkins et al., 1956, 1959; Luzzati y Nicolayef, 1963; Pardon et al., 1967; Richard y Pardon, 1970) dieron origen a la aparición de diferentes modelos en los que se suponía una estructura superhelicoidal para el DNA, superhélice, a la que las histonas se unirían de forma totalmente inespecífica, manteniendo dicha estructura (Pardon y Wilkins, 1972; Bram y Ris, 1971).

Después de esta fecha, diferentes trabajos, entre los que fundamentalmente se destacan la digestión de cromatina con nucleasas (Hewisch y Burgoyne, 1973; Rill y Van Holde, 1973; Sahasrabudhe y Van Holde, 1974; Van Holde et al., 1974; Noll, 1974), la observación microscópica de la cromatina en condiciones distin

tas de las utilizadas hasta entonces (Olins y Olins, 1973 y 1974; Van Holde e Isenberg, 1975; Langmore y Wooley, 1975 y Griffith, 1975) y el estudio de las interacciones histona-histona (Kornberg, 1974; D'Anna e Isenberg, 1974) supusieron un gran avance en el estudio de la estructura de la cromatina y se desplazaron los modelos citados con anterioridad, llegándose a una diferente concepción del problema, según la cual, la cromatina poseería una organización a base de subunidades globulares a las que se les comenzó a denominar cuerpos "v" ó nucleosomas.

La digestión de la cromatina a diferentes tiempos con nucleasas dió como resultado la aparición de diversos fragmentos, todos ellos múltiplos de una subunidad fundamental que contenía 200 pares de bases del DNA (Hewish y Burgoyne, 1973). Todos estos resultados, conjuntamente con los estudios sobre las interacciones histona-histona llevados a cabo por Kornberg y Thomas (1974), llevaron a estos autores a postular la composición total de estas subunidades fundamentales, que según esto estarían constituidas por un octámero de histonas de estequiometría  $(H2A-H2B-H3-H4)_2$ , una molécula de histona H1 y 200 pb de DNA. Por otra parte, estas subunidades repetitivas de 200 pb son aún sensibles al posterior ataque de la nucleasa micrococcal, obteniéndose un intermediario en el proceso de digestión que contenía 160 pb de DNA, el octámero y H1, y un fragmento posterior más resistente de 140-150 pb de DNA y en el que no se observaba la presencia de H1 (Shaw et al., 1976; Axel, 1975). Al fragmento de 140-150 pb de DNA y el octámero se le denominó "core" y al fragmento de 60 pb restante "linker".

Más recientemente, Hjelm et al. (1977) y Suau et al. (1977) utilizando la técnica de dispersión de neutrones obtuvieron un Rg (radio de giro) menor para el nucleosoma en presencia de D<sub>2</sub>O al 60% que en presencia de D<sub>2</sub>O al 35%, hecho que sugería una localización externa para el DNA, envolviendo al octámero de histonas en el core nucleosomal.

Estos y otros resultados llevaron a Finch y Klug en 1977 a proponer el modelo de estructura del nucleosoma en el que

los 140 pb recorrerían una vuelta y tres cuartos ( $1 \frac{3}{4}$ ) de superhélice toroidal alrededor del octámero de histonas. Esta superhélice tendría un diámetro de unos 9 nm y un paso de rosca de 2.8 nm e implicaría una longitud de 75-82 pb de DNA por vuelta en conformación B o próximo a ella.

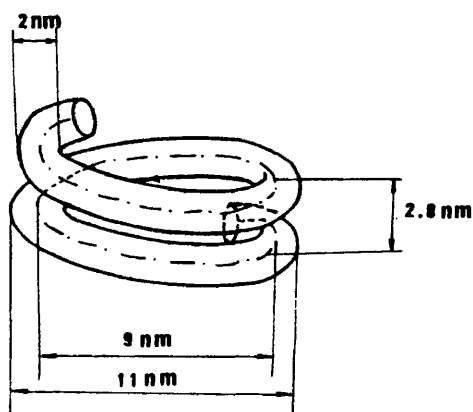


Figura 1. Modelo para la organización del DNA en el core nucleosomal (Finch et al., 1977).

Sin embargo, esta estructuración en collar de perlas de la cromatina parece ser únicamente un primer nivel de organización, dándose en los cromosomas un mayor grado de estructuración. La observación al microscopio electrónico de la cromatina (Finch y Klug, 1976) reveló la presencia de fibras de 300 Å de diámetro que según estos autores serían debidas a un enrollamiento solenooidal de la cadena de nucleosomas, pareciendo confirmar así la idea anterior.

De este modo, el papel estructural de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 o histonas "internas" (Isenberg, 1976) en la actualidad está perfectamente establecido (Felsenfeld, 1978). Sin embargo el preciso papel de la histona H1 no es aún conocido y generalmente se ha asociado con el DNA internucleosomal (Noll y Kornberg, 1977). Asimismo, en la actualidad se acepta que la his

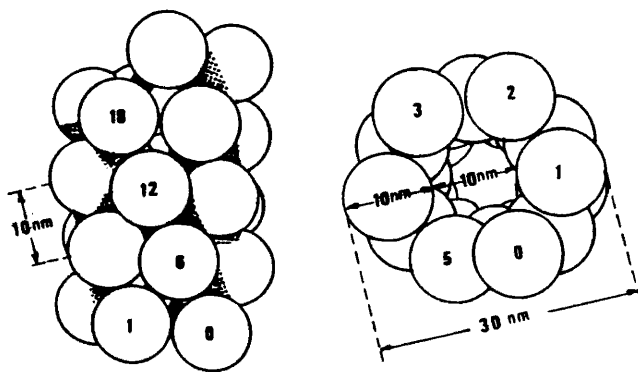


Figura 2. Modelo solenoidal propuesto para el enrollamiento de la cadena polinucleosómica.

tona H1 contribuye a un grado de compactación mayor de los nucleosomas en la fibra de cromatina (Littau et al., 1965; Bradbury et al., 1973; Finch y Klug, 1976; Renz et al., 1977), pero a pesar de los esfuerzos de varios autores para describir el modo de unión de la H1 al DNA en la fibra de cromatina (Vogel y Singer, 1976; Christiansen y Griffith, 1977; Gaubatz et al., 1977; Thoma et al. 1978; Boulikas et al., 1980 y Allan et al., 1980), el modo preciso de acción de la H1 permanece aún poco claro.

#### 1.2. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS HISTONAS MUY RICAS EN LISINA H1 Y H5.

La importante misión que parecían desempeñar las histonas muy ricas en lisina H1 y H5 en el complejo de la cro-



matina muy pronto despertó entre los investigadores el ánimo de realizar diferentes estudios estructurales en estas histonas.

En cuanto a la estructura primaria, las histonas del core, más pequeñas en tamaño molecular, fueron secuenciadas muy pronto en timo de ternera (DeLange et al., 1969 y Ogawa et al., 1969 (H4); De Lange et al., 1972 y Olson et al., 1972 (H3); Iwai et al., 1972 (H2B); Yeoman et al., 1972 y Sautié et al., 1974 (H2A)) y desde el principio se empezó a observar una cierta homología y conservatividad en la secuencia según se fueron obteniendo datos de estructura primaria de estas histonas internas en diferentes organismos.

La histona H1, de mayor tamaño molecular y de la cual existían diferentes subfracciones, incluso dentro de un mismo tejido, se secuenció con posterioridad.

La primera molécula de histona H1 sobre la que se realizaron estudios de estructura primaria fué la subfracción RTL3 de timo de conejo. Los estudios preliminares comenzaron con la fragmentación de la molécula con NBS gracias a la presencia de un solo resto de tirosina. Seguidamente se consiguió aislar y purificar el péptido 1-72 y se secuenció completamente por sucesivos solapamientos de péptidos tripticos (Bustín y Cole, 1969 y Rall y Cole, 1971). Los estudios posteriores realizados sobre el péptido 72-Cterminal llevaron al completo conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la subfracción RTL3 de H1 de timo de conejo (Cole, 1977). En ese tiempo, se obtuvo también la secuencia completa de la histona H1 de testículo de trucha (MacLeod et al., 1977), mostrando un alto grado de homología con la secuencia de la H1 de timo de conejo como se observa en la figura 3.

A la vista de estos datos y los resultados obtenidos acerca de la variabilidad de la región amino terminal de las diferentes subfracciones de H1 (Rall y Cole, 1971) parecía bastante clara la existencia de tres dominios estructurales distintos en la molécula de H1. La región N-terminal de aproximadamente 40 residuos contiene un elevado porcentaje de lisina y prolina y es

Trucha	A c A	E	V					A	P	A	P	A	P	A	A	A	A	P	A	K	P	K							
Conejo	A c S	E	A	P	A	E	T	A	A	P	A	P	A	P	A	E	K	S	P	A	K	K							
Trucha	K	A	A	A	K	P	K	K	S	G								P	A	V	G	E	L	A	G				
Conejo	K	A	A	K	K	P	G		A	G	A	A	K	R	K	A	A	G	P	P	V	S	E	L	I	T			
Trucha	K	A	V	A	A	S	K	E	R	S	G	V	S	L	A	A	L	K	K	S	L	A	A	G	G	Y			
Conejo	K	A	V	A	A	S	K	E	R	N	G	L	S	L	A	A	L	K	K	A	L	A	A	G	G	Y			
Trucha	D	V	E	K	N	N	S	R	V	K	I	A	V	K	S	L	V	T	K	G	T	L	V	E	T	K			
Conejo	D	V	G	K	N	N	S	R	I	K	L	G	L	K	S	L	V	S	K	G	T	L	V	E	T	K			
Trucha	G	T	G	A	S	G	S	F	K	L	N	K	K	A	V			E	A	K	K	P	A	K	K				
Conejo	G	T	G	A	S	G	S	F	K	L	D	K	K	A	A	S	G	E	A	K	P	K	P	K	K				
Trucha	A	A	A	P	K	A	K	K	V	A	A	K	K	P	A	A	A	K	K	P	K	K	V	A	A				
Conejo	A	G	A	A	K	P	K	K	P	A	G				A	T	P	K	K	P	K	K	A	A	G	A			
Trucha	K	K	A	V	A	A	K	K	S	P	K	K	A	K				K	P				A						
Conejo	K	K	A	V			K	K	T	P	K	K	A	P	K	P	K	A	A	A	K	P	K	V	A	K			
Trucha					T	P	K	K	A	A	K	S	P	K	K	A	T	K	A	A	K	P	K	A	A	K	P	K	
Conejo					P	K	S	P	A	K	V	A	K	S	P	K	K	A	K	A	V	K	P	K	A	A	K	P	K
Trucha	K	A	A	K	S	P	K	K	V	K	K	P	A	A	A	K	K	O	H										
Conejo	A	P	K	P	K	A	A	K	A	K	K	T	A	A	K	K	O	H											

Figura 3. Comparación de las secuencias de las histonas H1 de testículo de trucha y timo de conejo (MacLeod et al., 1977).

altamente variable de unas subfracciones a otras (Rall y Cole, 1971). La siguiente región, de aproximadamente 80 residuos en H1 de mamíferos, es más conservativa y contiene la mayor parte de los restos hidrofóbicos de la molécula (Jones et al., 1974; Isenberg, 1979). Finalmente, la región C-terminal, que contiene aproximadamente 100 residuos, de los cuales el 90% son lisina, alanina y prolina (Cole, 1977) con abundantes repeticiones de péptidos tipo Pro-Lys-Lys-Pro y Pro-Lys-Lys-Ala, se une fuertemente al DNA (Bradbury et al., 1975a).

Los estudios posteriores sobre secuencia de histonas H1 se centraron en H1 de invertebrados, concretamente sobre la histona  $\phi 1$  descrita por Palau et al. (1969). Después de los estudios iniciales, (Strickland et al., 1976 y 1980a), la secuencia completa de esta histona fué descrita por Strickland et al. (1980b). Asimismo se han obtenido un gran número de homologías entre esta secuencia y la que presenta la histona H1 de *Psammochinus miliaris*, cuyo gen ha sido clonado y deducida la secuencia de nucleótidos (Schaffner et al., 1978).

Los resultados obtenidos al comparar ambas secuencias demuestran una vez más que la zona más conservada de la molécula es el dominio central, mientras que las regiones N y C-terminales están sujetas a un mayor número de variaciones (Strickland et al., 1980b).

Por otra parte, la histona H5, que sustituye parcialmente a la H1 en eritrocitos nucleados de aves, aunque presentaba algunas diferencias importantes en su composición de aminoácidos con la histona H1 (Champagne et al., 1967 y 1968), sin embargo conservaba unas características estructurales muy similares a las de la histona H1.

Los estudios sobre la estructura primaria de las histonas H5 comenzaron fundamentalmente en la histona H5 de eritrocito de ganso y de eritrocito de pollo. Actualmente se conoce la secuencia completa de estas dos histonas (Yaguchi, 1979; Garel et al., 1975; Briand et al., 1980).

Parechinus	1	10
Psammechinus	Pro-Gly-Ser-Pro-Gln-Lys-Arg-Ala-Ala-Ser-Pro-Arg-	
Parechinus	20	
Psammechinus	Lys-Ser-Pro-Arg-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ser-Pro-Arg-	
Parechinus	30	
Psammechinus	Lys-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-Arg-Arg-Lys-Ala-Lys-Arg-	
Parechinus	40	
Psammechinus	Met-Thr-Asp-Thr-Ala-Lys-Lys-Val-Thr-Gln-	
Parechinus	50	60
Psammechinus	Ala-Arg-Ala-Ser-Thr-His-Pro-Pro-Val-Leu-Glu-Met-	
Parechinus	Lys-Lys-Pro-Ala-Ala-His-Pro-Pro-Ala-Ala-Glu-Met-	
Psammechinus	Val-Gln-Ala-Ala-Ile-Thr-Ala-Met-Lys-Glu-Arg-Lys-	
Parechinus	70	
Psammechinus	Vla-Thr-Thr-Ala-Ile-Lys-Glu-Leu-Lys-Glu-Arg-Lys-	
Parechinus	80	
Psammechinus	Gly-Ser-Ser-Ala-Ala-Lys-Ile-Lys-Ser-Tyr-Met-Ala-	
Parechinus	90	
Psammechinus	Gly-Ser-Ser-Arg-Gln-Ala-Ile-Ala-Asn-Tyr-Ile-Lys-	
Parechinus	100	
Psammechinus	Ala-Asn-Tyr-Arg-Val-Asp-Met-Asn-Val-Leu-Ala-Pro-	
Parechinus	110	
Psammechinus	Ala-His-Phe-Asp-Val-Glu-Ile-Asp-Gln-Gln-Leu-Val-	
Parechinus	113	
Psammechinus	His-Val-Arg-Arg-Ala-Leu-Arg-Asn-Gly-Val-Ala-Ser-	
Parechinus	110	
Psammechinus	Phe-Ile-Lys-Lys-Ala-Leu-Arg-Ser-Gly-Val-Ala-Lys-	
Parechinus	110	
Psammechinus	Gly-Ala-Leu-Lys-Gln-Val-Thr-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-	
Parechinus	110	
Psammechinus	Gly-Thr-Leu-Val-Gln-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-	
Parechinus	110	
Psammechinus	Gly-Arg-Phe-Arg-Val-	
Parechinus	110	
Psammechinus	Gly-Ser-Ile-Lys-Leu-	

Figura 4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las histonas H1 de *Psammechinus miliaris* (deducida de la secuencia de nucleótidos del gen de esta histona) y de H1 de *Parechinus angulosus* (Strickland et al., 1980b). Los residuos idénticos se encuadran en línea continua, mientras que los cambios conservativos se encuadran en línea de trazos.

Dominio N-terminal

H5 ganso	T D	S P I P A P	A P A A	K P K R	A R A	P R K
H5 pollo	T E	S L V L S P	A P A	K P K R	V K A	S R R
H1 trucha	A E V	A P A P A A	A P A	K A P K	K K A A	K P K K
H5 ganso	P	A S H P T				
H5 pollo	S	A S H P T				
H1 trucha		S G P A				

Dominio Central

H5 ganso	Y S E M I A A A I R A D	K S R G G S S R Q S I Q K Y
H5 pollo	Y S E M I A A A I R A E	K S R G G S S R Q S I Q K Y
H1 trucha	V G E L A G K A V A A S	K E R S G V S L A A L K K S
H5 ganso	V K S H	Y K V G Q H A D L Q I K L A I R R L L T T
H5 pollo	I K S H	Y K V G H N A D L Q I K L S I R R L L A A
H1 trucha	L A A G G Y D V E K N N	S R V K I A V K S L V T K
H5 ganso	G V L K Q T K G V G A S G S F R L A K	G D
H5 pollo	G V L K Q T K G V G A S G S F R L A K	S D
H1 trucha	G T L V E T K G T G A S G S F K L N K	K A V E

Dominio C-terminal

H5 ganso	K A K R S P A G R	K K K K K A A R K S T S P K K
H5 pollo	K A K R S P G	K K K K A V R R S T S P K K
H1 trucha	A K K P A K K A A A P K A K	K V A A K K P A A
H5 ganso	A A R P R K A R S P A K K P K A A	A R K A R K K
H5 pollo	A A R P R K A R S P A K K P K A T	A R K A R K K
H1 trucha	A K K P K K V A A K K A V A A	K K S P K K A K K
H5 ganso	S R A S P K K A K K	P K T V K A K S L K T S K P
H5 pollo	S R A S P K K A K K	P K T V K R A K S R K A S K A
H1 trucha	P A T P K K A A K S	P K K A T K A A K P K A A K P
H5 ganso	K K A R R S K P R A K S G A R K S P K	K K
H5 pollo	K K V K R S K P R A K S G A R K S P K	K K
H1 trucha	K K A A K S P K K V K K P A A A	K K

Figura 5. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las histonas H5 de eritrocito de ganso, H5 de eritrocito de pollo y H1 de testículo de trucha (Yaguchi et al., 1979). Resí-  
duos entre' '(Briand et al., 1980).

Cuando las secuencias de estas dos histonas H5 se comparan con la de la H1 de testículo de trucha (Figura 5) se vuelven a confirmar los resultados anteriormente citados; en primer término, se observa que el 40% de la histona H5 es homóloga con la H1 de testículo de trucha. Entre los residuos 76-98 de H5 de ganso y 78-100 de H1 de trucha, 15 de los 23 restos son idénticos (65%). En el dominio C-terminal, 8 de los 10 residuos de prolina de la H5 de ganso pueden ser alineados con 8 de los 12 restos de prolina presentes en H1 de trucha. Es decir, en H5 existen también tres diferentes dominios estructurales similares a los que contiene la histona H1. Este hecho parece apoyar la idea de que H1 y H5 son proteínas homólogas y que los genes de éstas proceden de un gen ancestral común (Yaguchi et al., 1979).

Al igual que en el caso de la histona H1, la alta conservatividad observada en el dominio central de la molécula de H5 ha sido correlacionada con un papel esencial de esta región en las interacciones proteína-proteína en la cromatina (Briand et al., 1980).

Con esta perspectiva, actualmente el interés en el estudio de la estructura primaria de estas proteínas está centrado en esa región central más conservada de la molécula en orden a clarificar el posible papel de esta zona de la molécula en la unión de la histona al DNA en la estructura de la cromatina. En este sentido, Allan et al. (1980) alinean las mitades N-terminales de diferentes histonas H1 y H5 de secuencias conocidas, tratando de establecer el mayor número de homologías posibles entre los dominios centrales de estas moléculas (Figura 6).

Más recientemente se han obtenido datos de secuencia de la histona H1 del maíz *Zea mays* (Hurley et al., 1980) y de la subfracción H1° de hígado de buey (Smith et al., 1980). La histona H1 de maíz ha sido secuenciada en un 25% y, mediante la utilización de un programa de ordenador puesto a punto para detectar homologías de proteínas (Sankoff, 1972; Needleman y Wunsh, 1970), se han conseguido establecer ciertas homologías entre esta histona y las histo-

```

T D S P I P      A P      A P A A K P K R A R A P      R K P
T E S L V L      S P      A P A      K P K R V K A S      R R S
S E A P A E T A      A P      A P A E K      S P A K      K K K A
S E A P A E T A      A P      A P A P K      S P A K T P      V K A
A E V      A P      A P A A A      A P A K A P      K K K A
P G S P Q K R A A S P R K S P R K      S P K K S P      R K A
T D T      A      K K V      T Q      K K P

```

```

      A S H P T Y S E M I A A A A I R
      A S H P T Y S E M I A A A A I R
A K K P      G A G A A K R R K A A G P P V S E L I T K A V A
A K K K      K P A G A R R K A S G P P V S E L I T K A V A
A A K P      K K      S G P A V G E L A G K A V A
S A S P R R K A K R A R A S T H P P V L E M V Q A A I T
      A A H P P A A E M V T T A I K

```

```

A D K S R G G S S R Q S I Q K Y V K S      H Y K V G Q H A
A E K S R G G S S R Q S I Q K Y I K S      H Y K V G H N A
A E K E R N G L S L A A L K K A L A A G G Y D V      E K N
A S K E R S G V S L A A L K K A L A A A G Y D V      E K N
A S K E R S G V S L A A L K K S L A A G G Y D V      E K N
A M K E R K G S S A A K I K S Y M A A      N Y R V D M N V
E L K E R K G S S R Q A I A N Y I K A      H F D V E I D Q

```

```

D L Q I K L A I R R L L T T G V L K Q T K G V G A S G S
D L Q I K L S I R R L L A A G V L K Q T K G V G A G S S
N S R I K L G L K S L V S K G T L V E T K G T G A S G S
N S R I K L G L K S L V S K G T L V E T K G T G A S G S
N S R V K I A V K S L V T K G T L V E T K G T G A S G S
L A P H V R R A L R N G V A S G A L K Q V T G T G A S G R
Q L V F I K K A L R S G V A K G T L V Q T K G T G A S G S

```

```

F R L A K      G D K A K R S P A G R K K K K K A A R
F R L A K      S D K A K R S P      G K K K A K + 74 re-
F K L D K K A A S G E      A K P K P      K K A G A A K P K
F K L N K K A A T G E      A K P K      A      K K A G A A K + 90
F K L N K K A V      E      A K      K P A      K K A A A P K A K
F R V G      A V      A K P K K A K K T S A A A K A K
I K L + 102 residuos

```

K S + 74 residuos	H5 ERITROCITO DE GANSO	
síduos	H5 ERITROCITO DE POLLO	
K P A G + 83 residuos	H1 CONEJO (RTL 3)	<b>H1/5</b>
resíduos	H1 TERNERA (CTL 1)	
K V A A + 72 residuos	H1 TESTICULO DE TRUCHA	
K A + 113 residuos	H1 ESPERMA DE ERIZO DE MAR (P.A.)	
	H1 EMBRION DE ERIZO DE MAR (P.M.)	

Figura 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos de los dominios N-terminal y central de las histonas H1 y H5 (Allan et al., 1980).

nas H1 y H5 secuenciadas hasta el momento, sobre todo en el dominio central (Hurley et al., 1980).

La subfracción H1° de hígado de buey ha sido fragmentada mediante CNBr gracias a la presencia de un residuo de metionina en la molécula y a partir del péptido C-terminal obtenido de este tratamiento se ha secuenciado un fragmento de 19 aminoácidos correspondiente a la región N-terminal de dicho péptido (Smith et al., 1980).

H1° Bovina:	<u>met-ile-val-ala-ala-ile-gln-ala-glu-lys-asn-arg-ala-</u>
H5 Pollo:	<sup>31</sup> <u>met-ile-ala-ala-ala-ile-arg-ala-glu-lys-ser-arg-gly-</u>
H5 Ganso:	<sup>32</sup> <u>met-ile-ala-ala-ala-ile-arg-ala-asp-lys-ser-arg-gly-</u>
H1 Bovina:	<sup>45</sup> <u>leu-ile-thr-lys-ala-val-ala-ala-ser-lys-glu-arg-ser-</u>

gly-thr- X - X -gln- X -ile
gly-ser-ser-arg-gln-ser-ile-
gly-ser-ser-arg-gln-ser-ile-
gly-val-ser-leu-ala-ala-leu-

Figura 7. Comparación de secuencias parciales de aminoácidos de H1°, H5 eritrocito de pollo y de ganso y una subfracción de H1 bovina. (Smith et al., 1980).

Esta secuencia obtenida, que corresponde aproximadamente a la región 30-50 de la molécula de H1°, muestra mayor analogía con las histonas H5 que con la histona H1 de mamíferos, por lo que los autores suponen una similitud funcional entre esta subfracción H1° y la H5 de eritrocitos de aves (Smith et al., 1980).



### 1.3. ESTUDIOS DE ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCIARIA DE LAS HISTONAS MUY RICAS EN LISINA H1 Y H5

Desde que las histonas lograron fraccionarse y se aislaron los cinco grupos principales de las mismas, han sido objeto de numerosos estudios estructurales a todos los niveles. Los estudios previos acerca de las transiciones estructurales de las histonas en solución indicaban un comportamiento marcadamente diferente para la histona H1 cuando se la comparaba con las demás fracciones. Las histonas H1 y H5 se desplazan de la cromatina a concentraciones salinas menores que las necesarias para disociar las demás histonas (Ohlenbusch et al., 1967; Murray et al., 1970); la histona H1 no tiene la misma capacidad de formación de agregados en solución que el resto de las histonas (Edward et al., 1969). Asimismo las transiciones conformacionales producidas por el aumento de la fuerza iónica del medio producen un porcentaje menor de estructura secundaria ordenada en la molécula de H1 que en las otras cuatro histonas (Bradbury et al., 1965; Jirgensons et al., 1965; Bradbury et al., 1967 y 1970). La histona H5 también exhibe cambios conformacionales comparables a los de la histona H1 (Williams et al., 1973).

Conforme fueron avanzando los estudios de secuencia en estas histonas, comprobándose una distribución asimétrica de sus residuos básicos, así como los estudios en complejos H1/H5-DNA, el comportamiento estructural de las histonas muy ricas en lisina fue tomando una gran importancia como punto de referencia en el esclarecimiento de sus funciones en la cromatina.

Los estudios más extensos en este campo fueron realizados en H1 de timo de ternera y H5 de eritrocito de pollo. La aplicación de la resonancia magnética nuclear y el dicroísmo circular en la histona H1 de timo de ternera y en los péptidos 1-72 y 73-Cterminal (productos de rotura con NBS de la histona) reveló la existencia de estructuras plegadas específicamente (semejante a las proteínas globulares) en la región 40-115 de la H1 de timo, inducidas por un aumento de la fuerza iónica o del pH (Bradbury et al., 1975a).

Esta estructura globular de la histona no contiene estructura  $\beta$  (Bradbury et al., 1965; Guillot et al., 1977) pero sí regiones en  $\alpha$ -hélice. Estas regiones, según Bradbury et al. (1975a) se extienden desde los residuos 42-55 y 58-75, según el cálculo que realizaron por un procedimiento de predicción de  $\alpha$ -hélice para una determinada cadena polipeptídica (Lewis et al., 1974).

Con el fin de obtener más datos acerca de los diferentes dominios de la molécula, la histona H1 se sometió a diferentes procesos de fragmentación. De este modo, Bradbury et al. (1975b) estudiaron por RMN y dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano los dos péptidos (1-106 y 107-Cterminal) que resultan de la digestión controlada con quimotripsina de la histona H1. El fragmento N-terminal (1-106) sufre una estructuración inducida por sal en solución acuosa diferente a la que tiene lugar en la molécula intacta. Por otra parte los datos de dicroísmo circular sugieren una similitud en estructura secundaria entre el péptido y la molécula de histona. El fragmento C-terminal (107-Cterminal) apenas se estructura con sal, pero, sin embargo, se une muy fuertemente al DNA.

Estudios paralelos en la histona  $\phi 1$  (histona de espermatozoide de erizo de mar, similar a la H1 de mamíferos) demostraron que esta proteína se comporta de forma idéntica a la H1 en cuanto a las transiciones estructurales inducidas por sal y pH (Puigdomenech et al., 1975).

Chapman et al. (1976) fragmentaron la H1 de timo de ternera con trombina (proteasa que rompía preferentemente en la región Pro<sup>119</sup>-Lys<sup>122</sup>-Lys-Ala) obteniendo así dos nuevos péptidos de la molécula en los que poder determinar nuevos estudios estructurales. El péptido 1-122 posee la totalidad de la estructura en  $\alpha$ -hélice de la molécula de histona, mientras el C-terminal muestra muy poca o ninguna estructura. Con esto se estableció el límite C-terminal de la región capaz de adquirir estructura entre los residuos 107-122. El límite N-terminal de esta región no fue tan fácil de establecer debido a la variabilidad que presenta la región N-terminal de la proteína.

Sin embargo otros autores, estudiando las transiciones conformacionales que ocurren en las diferentes subfracciones de H1 de timo de ternera, obtienen algunos resultados discordantes con los de Bradbury. Smerdon e Isenberg (1976) observaron que la transición estructural que tiene lugar en las diferentes subfracciones de H1 de timo de ternera como consecuencia de un aumento del pH ocurre aproximadamente a pH 9.0 y no entre pH 3 y 6 como se había descrito anteriormente (Bradbury et al., 1975a). Por otra parte, estos autores demuestran que la anisotropía e intensidad de fluorescencia de la H1 de timo de ternera se incrementan como consecuencia del cambio conformacional, por lo que concluyen que las regiones que contienen los residuos de tirosina en las diferentes subfracciones deben estar implicadas en el proceso de estructuración inducido por sal. Este hecho ya había sido apuntado por Bustin (1971) como resultado de los estudios de modificación del residuo de tirosina de la histona H1 de timo de ternera.

Utilizando las mismas técnicas (espectroscopía de resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular) se comenzaron a estudiar las características estructurales de la histona H5 (Crane-Robinson et al., 1976). Siguiendo una estrategia parecida a la empleada anteriormente con la H1, se fragmentó la molécula mediante diferentes agentes químicos (CNBr y NBS fundamentalmente) obteniéndose así diferentes regiones de la molécula. Se demostró que la histona H5 posee una estructura secundaria y terciaria relativamente similar a la de la histona H1 en soluciones salinas y que los residuos aromáticos de la H5 están implicados en el cambio conformacional. Sin embargo, mientras que en H1 los 40 primeros residuos de la región N-terminal no forman parte de la estructura globular de la proteína, en la histona H5 la rotura por el residuo 31 destruye totalmente la capacidad de estructuración de la histona. Estos resultados llevaron a proponer un modelo sobre la posible localización de la estructura secundaria de la histona H5 (Crane-Robinson et al. 1976).

El experimento clave en este terreno fué la obtención de un fragmento límite de la digestión controlada con tripsina de

la molécula de H1 o del péptido 1-122 (Hartman et al., 1977). Este fragmento límite corresponde a la región 35-120 de la molécula y es capaz de adquirir una estructura globular en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica. Los estudios realizados en el mismo demostraron que contiene el total de la estructura ordenada que es capaz de adquirir la molécula intacta. Estos autores postularon, a la vista de estos datos, un modelo de los diferentes dominios estructurales de la histona H1.

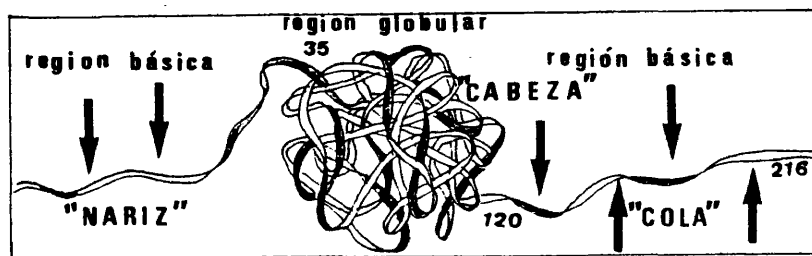


Figura 8. Los tres dominios estructurales de la histona H1 (Hartman et al., 1977).

El dominio N-terminal, de aproximadamente 35 residuos, corresponde a la región más variable entre las distintas subfracciones. Los 85 residuos siguientes constituyen el dominio central más conservativo y capaz de adquirir estructura globular con el aumento de la fuerza iónica. Finalmente la región C-terminal, de aproximadamente 100 residuos, es predominantemente básica y se encuentra en estructura estadística.

Paralelamente y siguiendo un procedimiento idéntico se consiguió, posteriormente, aislar un péptido similar de la digestión

tríptica de la histona H5 de eritrocito de pollo, al cual se le de nomino GH5 (ya que contiene la región globular de dicha histona) (Avilés et al., 1978). Gracias a los datos de secuencia de esta histona que se conocían en ese tiempo, se consiguió determinar a qué zona de la molécula corresponde dicho fragmento (residuos 22 al 100). El péptido GH5 tiene un similar comportamiento estructural que su homólogo en H1 de mamífero. Estos resultados proponen una división de la histona H5 en tres dominios estructurales análogos a los descritos para la H1; la región N-terminal, menor que en la H1, de 21 residuos de aminoácidos, una segunda región compacta de 79 residuos y una región C-terminal, desordenada en solución, de 85 aminoácidos. La diferencia en carga neta positiva en las regiones N-terminales de H1 y H5 debe traducirse en diferentes inter acciones con el DNA.

Una vez que se habían conseguido aislar y purificar los péptidos globulares de estos dos tipos de histonas, se realizaron sobre ellos extensos estudios estructurales fundamentalmente por es pectroscopía de RMN (Chapman et al., 1978a y 1978b). Los resultados más significativos obtenidos por estos autores se resumen a conti nuación.

En la región globular de H1 de timo de ternera:

- La guanidilación de los residuos de lisina no afecta a la capacidad de estructuración de esta región, por lo que probablemente todos los residuos de lisina se encuentran en la superficie de la estructura globular, hacia el medio polar.
- Los residuos ácidos también tienen una localización externa.
- El único residuo de tirosina que contiene la molécula está orien tado hacia el interior de la región globular y rodeado de un en torno hidrofóbico.
- La modificación de este residuo de tirosina por nitración o io dación desplaza el equilibrio hacia la forma no estructurada. Este resultado está de acuerdo con el obtenido por Padrós et al. (1978), autores que demuestran que la desnaturalización térmica de la región globular de la histona H1 lleva consigo un desple gamiento del entorno que contiene la tirosina.

En la región globular de H5 de eritrocito de pollo:

- El único residuo de tirosina que se encuentra en un entorno si milar al de la tirosina de timo es el residuo 28, mientras que la tirosina 58, homóloga en la secuencia a la tirosina 72 de ti mo, está situada en un entorno más polar.
- Tan sólo dos regiones, aparentemente homólogas en estructura primaria, de ambas moléculas, parecen tener la misma estructura secundaria (residuos 30-40 en H5 y 44-54 en H1).
- Estas diferencias probablemente sean debidas a que ambas zonas globulares han evolucionado por separado (Chapman et al., 1978b).

Posteriormente, los estudios realizados de digestión triptica de complejos H5/H1-DNA demostraron la existencia de pépti dos resistentes a la digestión en ambas histonas, idénticos a los encontrados en las histonas libres en solución, confirmandose de este modo la presencia de los tres dominios estructurales de la histona cuando se une al DNA (Avilés et al., 1979). Sin embargo, la estructura precisa de esta región globular no tiene por qué man tenerse estrictamente idéntica en ambas situaciones. El marcaje de spin de la única tirosina de H1 de timo o de los residuos hidroxilados muestra una ralentización en el tiempo de correlación rotacional ( $\tau_c$ ), lo cual indica la existencia de cambios conformacionales en la zona globular de la molécula cuando esta se une al DNA (Lawrence et al., 1980).

Recientemente se ha logrado aislar una región de idén ticas características a los péptidos 35-120 de H1 de timo y 22-100 de H5 de eritrocito de pollo, por digestión triptica de la histona  $\phi$ 1 de esperma de erizo de mar. Este fragmento posee aproximadamente 82 residuos y muestra una estructura secundaria muy similar a los péptidos homólogos de H1 y H5 (Puigdomenech et al., 1980).

La importancia de los tres dominios estructurales dife rentes, que poseen las histonas muy ricas en lisina, en su función precisa en la cromatina es un hecho aceptado en la actualidad. La región globular de la molécula, muy conservada, posiblemente esté implicada en las interacciones proteína-proteína, mientras que las regiones N y C-terminales sean fundamentalmente los dominios de in

teracción con el DNA.

#### 1.4. H1 Y ESTRUCTURA DE CROMATINA

Existen numerosos resultados, entre los que se encuentran una transcripción más rápida "in vitro" de la cromatina desprovista de H1 (Simpson, 1974a), una conformación más extendida para la cromatina carente de H1 (Polacow y Simpson, 1973; Simpson 1974b) así como para la cromatina transcripcionalmente activa "in vivo" (Scheer, 1978), una temperatura de desnaturalización menor para cromatina sin H1 (Reeck et al., 1972) y para cromatina de cromosomas politénicos que está formando "puffs" con relación a la que no encuentra en este estado (Pages y Alonso, 1978), una preferente susceptibilidad a la DNasa I en genes transcripcionalmente activos (Weintraub y Graudine, 1976; Garel y Axel, 1976) y un incremento en la viscosidad intrínseca de la cromatina cuando se extrae la H1 (Henson y Walker, 1970 y 1971; Lewis et al., 1976), que ponen de manifiesto la importante significación de la histona H1 en los procesos de transcripción "in vivo" así como su participación en estructuras de orden superior en el complejo de la cromatina.

##### 1.4.1. H1 Y EL PRIMER Y SEGUNDO NIVEL ESTRUCTURAL

###### 1.4.1.1. EL CROMATOSOMA

Cuando la cromatina se digiere con nucleasa micrococcal, en el curso de la reacción hidrolítica se pueden diferenciar distintos niveles de organización, correspondientes a diferentes intermediarios, observándose cuatro grandes pausas en el proceso de degradación: (A) partículas con un coeficiente de sedimentación de 40s, que contienen aproximadamente 8 nucleosomas en una estructura compacta (Hozier et al., 1977), (B) una partícula que consta de una subunidad repetitiva, variable según el organismo y

tejido, generalmente compuesta de 185-205 pb de DNA, que se denominó nucleosoma (Noll, 1974; Axel, 1975; Sollner-Webb y Felsenfeld, 1975; Shaw et al., 1976; Noll y Kornberg, 1977) (C) una partícula que albergaba aproximadamente 160 pb de DNA, una molécula de H1 ó H5 y el octámero de histonas (Varshavsky et al., 1976; Whitolck y Simpson, 1976; Bakayev et al., 1977; Todd y Ganard, 1977; Noll y Kornberg, 1977) y (D) por último una partícula compuesta por 140 pb de DNA y las histonas internas, pero que carecía de la histona muy rica en lisina H1 ó H5, el core nucleosomal.

Mientras la estructura y función del fragmento de DNA internucleosomal permanece poco esclarecida, siendo este variable en longitud de unos organismos a otros, la partícula de 160 pb de DNA muestra una longitud mucho más constante (Morris, 1976; Noll, 1976; Lohr et al., 1977). Esta última subunidad, que además contiene las histonas internas y la histona H1, se denominó cromatosoma (Simpson, 1978). Los estudios de desnaturalización térmica y de digestión con DNasa I de cromatosomas con y sin H1 (H5) indicaban que los 20 pb extra del cromatosoma se encuentran localizados 10 en cada extremo del core, interaccionando con una molécula de H1, estabilizándose de este modo una estructura de dos vueltas de superhélice, con 80 pb/vuelta. La ausencia de la histona H1 (H5) provoca, por tanto, una desestabilización de esos 20 pb, pudiendo ser ésta la causa primaria del proceso de descondensación de la cromatina y de que los puntos de entrada y salida del core sean distintos. De esta manera, el cromatosoma puede ser la subunidad repetitiva básica en el cromosoma (Simpson, 1978).

#### 1.4.1.2. H1 Y LAS SUPERESTRUCTURAS INDUCIDAS POR SAL EN LA CROMATINA

Los estudios de microscopía electrónica de cromatina con y sin H1 (Thoma et al., 1979) han sido de extraordinaria importancia en la investigación de la función de la histona H1.

En medios de baja fuerza iónica, la cromatina se mues-



tra como un filamento de nucleosomas, que se condensa, al ir aumentando la concentración salina, en diferentes estados intermedios hasta un progresivo desarrollo de la superestructura en la que los nucleosomas aparacen entrelazados.

La cromatina sin H1 también sufre una condensación a altas fuerzas iónicas, pero esta superestructura no posee las mismas características que cuando está presente la H1, y posiblemente esta condensación anómala sea únicamente debida al efecto que produce la fuerza iónica sobre un polielectrolítico. En este sentido, Vollenwheider (1975) observa que el DNA libre es capaz de condensarse como consecuencia de un aumento en la fuerza iónica del medio.

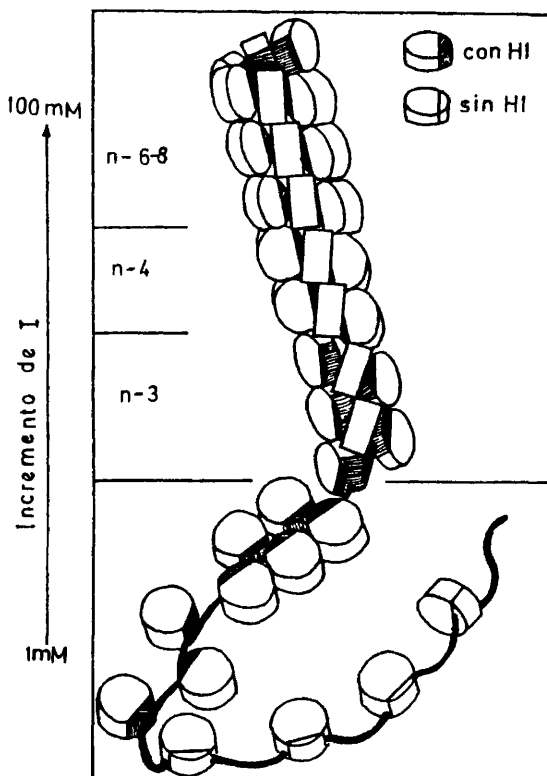


Figura 9. Modelo idealizado para las superestructuras helicoidales de la cromatina con H1 y las transiciones estructurales como consecuencia del aumento de la fuerza iónica (Thoma et al., 1979).

Basándose en los resultados de microscopía electrónica de los diferentes intermediarios así como la determinación de los puntos de corte exactos de la DNasa I en el nucleosoma (Lutter, 1979), Thoma et al., (1979) propusieron un primer modelo sobre la localización de la histona H1 (H5).

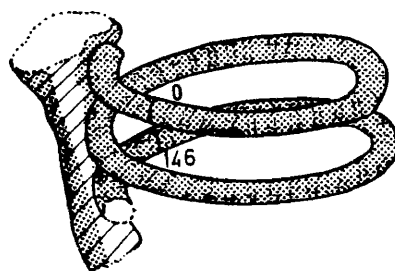


Figura 10. Localización de la histona H1 (H5) en el cromatosoma (Thoma et al., 1979).

Según este modelo la H1 se encuentra estabilizando 20 pb de DNA (166-146 pb) del cromatosoma y estaría situada en el interior del solenoide que los nucleosomas forman en un segundo nivel de estructuración de la cromatina. Esta localización interna explicaría la formación de homopolímeros de H1 observados cuando la cromatina se trata con diversos agentes de reticulación (Chalkley y Hunter, 1975; Olins y Wright, 1973; Thomas y Kornberg, 1975).

De este modo, una determinada molécula de histona H1 situada en una vuelta concreta del solenoide podría interaccionar con otras moléculas de H1 o con el DNA de las vueltas contiguas (anterior y posterior) del solenoide.

#### 1.4.1.3. LOCALIZACION DE LA HISTONA H1 EN LA CROMATINA

Los experimentos de reticulación covalente de H1 en cromatina nativa de células de ratón demuestran la existencia de dímeros H1-H2A y H1-A24 en los nucleosomas que contienen esta pro

teína, confirmando así una proximidad espacial entre estas histonas (Bonner y Stedman, 1979). Estudios posteriores demostraron que las regiones de ambas moléculas implicadas en la reticulación corresponden a los residuos 74-106 en la histona H1 y la región comprendida entre los residuos 58-129 en la molécula de H2A. Estas dos zonas de las moléculas se encuentran en las regiones globulares de las mismas, por lo que estos dominios globulares deben ser importantes en las interacciones proteína-proteína (Boulikas et al., 1980). Posteriores experimentos de reticulación revelaron una proximidad relativa de la H1 al octámero de histonas, sugiriendo de nuevo que el cromatosoma puede ser la unidad repetitiva básica y que el fragmento linker corresponde a la zona restante de aproximadamente 40 pb (Rendelhuber et al., 1980).

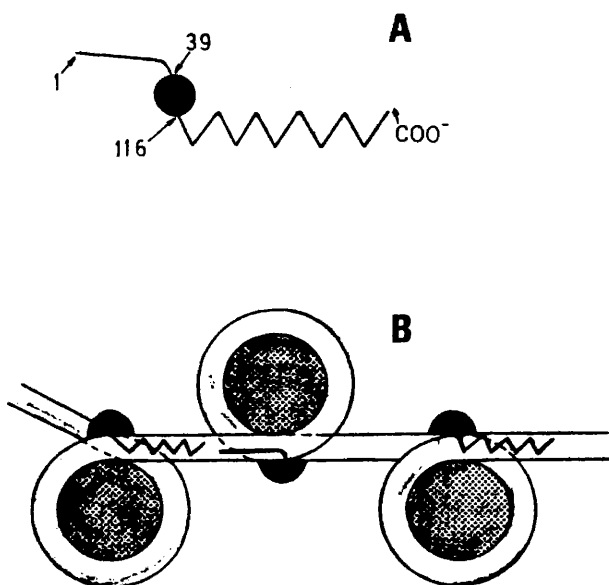


Figura 11. (A) Los 3 dominios estructurales de H1. (B) Modelo de la localización de la histona H1 en la fibra polinucleosómica (Boulikas et al., 1980).

Por otra parte, los trabajos de reconstitución de cromatina con diferentes regiones de la molécula de H1 y de H5 y el estudio del comportamiento de las cromatinas así reconstituidas en sedimentación y accesibilidad a la nucleasa micrococcal (Allan et al., 1980) aportaron resultados interesantes a la hora de tratar de localizar los diferentes dominios de estas histonas en la estructura de la cromatina y su diferente funcionalidad en la misma.

Los diferentes fragmentos de H1 que utilizaron estos investigadores fueron NH1 (1-98), GH1 (36-121), GH5 (22-100 de H5), NGH1 (1-121) y CH1 (122-213). Los resultados indican que ninguno de ellos es capaz de dar cuenta de las características de sedimentación de la cromatina reconstituida con H1 intacta, si bien los péptidos que mayor grado de aproximación demuestran son aquellos que contienen la región globular de las histonas (NGH1, GH1 y GH5). Cuando la estructura de este dominio central globular se modifica a consecuencia de la iodación en el residuo de tirosina 72, la histona así modificada (MH1) interacciona con el DNA de una manera más inespecífica (Allan et al., 1980). Mientras que los péptidos NGH1 y GH1 son capaces de proteger un fragmento de 168 pb, los fragmentos restantes de esta histona (NH1 y CH1) resultan incapaces de ejercer tal protección, obteniéndose partículas de 146 pb de DNA en la degradación nucleolítica. Este hecho posiblemente es relacionado con la ya demostrada necesidad de la región globular de la histona para que ésta muestre su capacidad preferencial de unirse a DNA superhelicoidal (Singer y Singer, 1976).

Según esto, la función primaria de la región globular de las histonas muy ricas en lisina H1/5 es la de cerrar el core en el seno del cromosoma, hecho que haría aumentar el coeficiente de sedimentación, aunque no supondría la condensación total del nucleofilamento. Basándose en todos estos resultados Allan et al. (1980) proponen un modelo de localización de los diferentes dominios estructurales de estas histonas (Figura 12.).

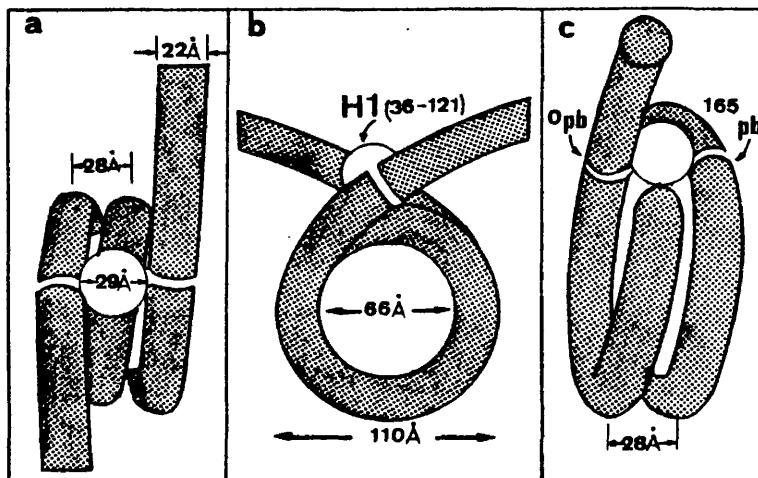


Figura 12. Modelo propuesto para la localización del dominio globular de las histonas muy ricas en lisina en el cromatoma (Allan et al., 1980).

#### 1.4.2. H1 Y NIVELES SUPERIORES DE ORGANIZACION

El dicroísmo circular y la desnaturalización térmica indican que la histona H1 se une preferentemente a regiones del DNA ricas en A-T. Sin embargo, no todos los posibles sitios de unión de H1 están ocupados por la histona (Sponar et al., 1972a y 1972b; Varsharsky et al., 1976). Por otra parte en el DNA de eucariontes existen entremezcladas secuencias repetitivas y no repetitivas. Los segmentos repetitivos de aproximadamente 300 pb mientras que los no repetitivos ocupan alrededor de 800-1000 pb (Britton et al., 1968; Davidson et al., 1973a y 1973b). La longitud total de ambas regiones ocupa por tanto 1200 pb aproximadamente, correspondiente a una longitud equivalente a seis nucleosomas.

somas. Además, estas regiones ricas en A-T no parecen estar distribuidas al azar en el DNA, sino que se concentran en las regiones internucleosomales (Schmitz y Ramanathan, 1980). Basándose en todos estos argumentos, estos últimos autores postulan: 1° el segundo nivel de estructuración de los polínucleosomas en solución es una hélice extendida con 5-7 nucleosomas por vuelta; 2° las regiones repetitivas de DNA se agrupan en bloques a lo largo de regiones específicas en el segundo nivel de organización; 3° las histonas muy ricas en lisina se unen preferencialmente a secuencias repetitivas de DNA de alto contenido en A-T.

De acuerdo con estos postulados, y teniendo presente que los residuos de la histona que están implicados en la especificidad por DNA superhelicoidal se encuentran en la región 72-106 (Singer y Singer, 1977), Schmitz y Ramanathan (1980) sugieren un posible mecanismo para la generación del tercer nivel de estructuración de la cromatina, inducido éste por un cambio conformacional que tiene lugar en las histonas muy ricas en lisina. Según este modelo, el proceso de iniciación es generado por una reestructuración de los residuos 72-106 de la H1, lo cual provoca un aumento de afinidad de la región globular por DNA superhelicoidal existente en los cores de vueltas adyacentes en el segundo nivel estructural. Puesto que en las regiones internucleosomales, ricas en A-T, pueden unirse más de una molécula de H1, se podría favorecer la formación de puentes que conectan dos cores con la región internucleosomal. Como resultado de un efecto acumulativo de gran número de tales conexiones se genera un tercer nivel estructural helicoidal (Schmitz y Ramanathan, 1980) según se muestra en la figura 13.

Incluso con este tercer nivel de estructuración sólo se consigue explicar un 2% de la compactación total observada en la cromatina condensada. Los estudios de microscopía electrónica de cromosomas en metafase revelan la presencia de "tubos" con diámetros de 500 Å, 2000 Å y 6000 Å (Sedat y Manuelidis, 1977); sin embargo, los niveles de estructuración superior de la cromatina permanecen aún muy confusos.

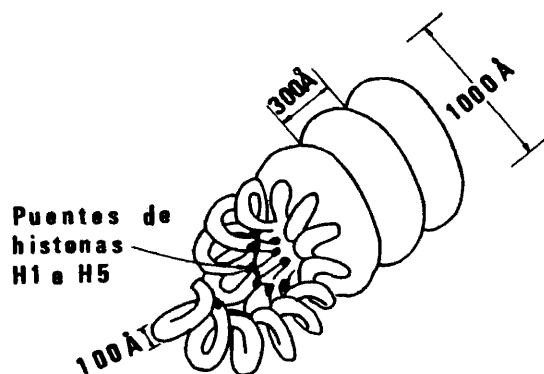


Figura 13. Modelo propuesto para el plegamiento en un tercer nivel de organización de los polinucleosomas (Schmitz y Ramanathan, 1980).

Por otra parte, aún quedan muchos resultados experimentales incapaces de relacionarse con los esquemas de localización y función propuestos en la actualidad para estas histonas. Los resultados de Marion y Roux (1980) indican que las histonas internas (H2A, H2B, H3 y H4) podrían por sí mismas ejercer una protección sobre 163 pb de DNA en el nucleosoma. Las cadenas polinucleosómicas presentan dos sitios de distinta afinidad para la unión específica de H1 (Nelson et al., 1979; Tood y Garrard, 1979). Además los parámetros de dicroísmo circular y coeficiente de sedimentación de la cromatina nativa se ajustan mejor cuando se supone una relación H1/nucleosoma de dos (Mc. Cleary y Fasman, 1980; Allan et al., 1980), por lo que la estequiometría exacta de la histona H1 en la cromatina permanece aún poco clarificada (Varsharsky et al., 1976; Hayashi et al., 1978; Goodwin et al., 1977). La extracción de la histona H1/5 de mononucleosomas distorsiona la estructura del nucleosoma, de forma que únicamente 100-110 pb, alta-

mente estabilizados, permanecen con una estructura inalterada (Cowman y Fasman, 1980). Estos resultados, junto con otros muchos interrogantes de carácter general, como la razón de la microheterogeneidad y su repercusión en la estructura de la cromatina, el papel de los procesos de modificación covalente observados en estas histonas a lo largo del ciclo celular y la funcionalidad concreta de los dominios N y C-terminales de estas histonas, hacen necesario un extenso estudio estructural de las mismas en un mayor número de organismos, con fines comparativos y que permita generalizar los diferentes puntos que en la actualidad permanecen indeterminados.

#### 1.5. DIRECCION DE LA INVESTIGACION REALIZADA

Las histonas muy ricas en lisina muestran, como se ha comentado, características muy peculiares en relación con las otras fracciones de histonas y tiene una clara implicación en los niveles de organización estructural superiores al nucleosoma. Todos los estudios funcionales sobre esta histona lógicamente deben ser relacionados con conocimientos previos de la estructura de la misma, necesarios en muchas ocasiones para la interpretación de resultados posteriores.

Sin embargo, todos los estudios estructurales llevados a cabo hasta la actualidad han abarcado un número muy reducido de materiales biológicos y a veces los resultados se han extrapolado de manera excesiva. En insectos existen muy pocos datos sobre las histonas muy ricas en lisina; únicamente se han llevado a cabo estudios sobre tamaño molecular y composición de aminoácidos de la H1 de *Drosophila melanogaster* (Alfageme et al., 1974).

En nuestro laboratorio se ha creado una línea de investigación sobre las histonas del díptero *Ceratitis capitata*. Los estudios realizados sobre la histona H1 del insecto en dicho laboratorio han llevado al aislamiento y purificación cromatográfica de la H1 del díptero así como a la clarificación de la capacidad



de agregación de la molécula por formación de puentes disulfuro y la separación de estos productos de agregación (Franco et al., 1974 y 1977).

Resulta, por tanto, de gran interés, y es el principal objeto de este trabajo de investigación, el estudiar en detalle las características estructurales de la histona H1 de *Ceratitis capitata* y muy especialmente las peculiares de la región resistente a la tripsina de la histona. Todos estos estudios se comparan con investigaciones paralelas realizadas con la histona y su región resistente a la tripsina de timo de ternera; este último material se ha elegido debido a que la histona H1 de timo de ternera ha sido una de las más estudiadas y de la que más datos se poseen en la bibliografía.

De esta forma, este trabajo pretende aportar datos hacia un mayor conocimiento estructural de las histonas H1, y por tanto a su posible papel en la estructura de la cromatina.

## **2.MATERIALES Y METODOS**

## 2.1. PREPARACION DE LOS MATERIALES BIOLOGICOS

El material biológico utilizado, el díptero holometábolo *Ceratitis capitata*, ha sido cedido por el Instituto de Investigaciones Agronómicas (El Encín, Alcalá de Henares), donde es cultivado según el procedimiento descrito por Municio et al. (1970). Los insectos fueron recogidos en estado de adulto farato y previamente desprovistos de toda posible contaminación procedente de la dieta, se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

Por otro lado, el timo de ternera fué cedido por el Matadero Municipal (Madrid) y congelado instantaneamente tras su extracción en aire líquido durante su transporte, posteriormente fué utilizado o bien guardado a  $-60^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

## 2.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS HISTONAS H1

### 2.2.1. PREPARACION DE LA CROMATINA

El primer paso en el aislamiento de las histonas H1, tanto de *Ceratitis capitata* como de timo de ternera, es la obtención de cromatina. Para lo cual se utilizó el método descrito por Dicks y Johns (1969), si bien en el caso del insecto se llevó a cabo este proceso ligeramente modificado (Franco et al., 1974).

La totalidad de los pasos de esta preparación se realizó a una temperatura comprendida entre 0 y  $4^{\circ}\text{C}$ , según el procedimiento que se describe a continuación.

El material intacto (adulto farato o timo de ternera) se homogeneizó en un homogeneizador de aspas Omni-Mixer Sorvall a 220 V durante 5 minutos, en aproximadamente cinco volúmenes de una disolución de NaCl 0.14 M-citrato trisódico 0.01 M a pH 7,5, que contenía además el agente inhibidor proteolítico PMSF, a una con-

centración de 50 mM, con objeto de evitar la posible degradación proteolítica durante el proceso. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de gasa. El filtrado se centrifugó en un rotor angular GS-3 en centrífuga Sorvall RC-5 a 1500 g durante 20 minutos. El sedimento resultante se lavó repetidas veces en un volumen de NaCl 0.14 M-Tris 0.01 M a pH 7.5, efectuándose los mismos por resuspensión del sedimento en el medio anteriormente citado y posterior centrifugación en similares circunstancias durante 15 minutos. El lavado se repitió hasta que el sobrenadante quedó completamente claro. Normalmente dos o tres lavados fueron suficientes para la cromatina de timo de ternera; mientras que para la del insecto hicieron falta cuatro o cinco lavados. El sedimento final en ambos casos, cromatina cruda, se utilizó directamente como material para la extracción de H1.

#### 2.2.2. EXTRACCION SELECTIVA DE LA HISTONA H1

Las histonas H1 se obtuvieron a partir de cromatina cruda según el método descrito por Johns y Butler (1962).

Al sedimento de cromatina cruda se le añadió medio volumen de PCA 5% (p/v) con respecto al peso inicial del material biológico empleado y se homogeneizó en Omni-Mixer Sorvall a 220 V durante 5 minutos. El ácido perclórico tiene como efecto solubilizar de la cromatina la histona H1, así como otro pequeño número de proteínas cromosomales no histonas, principalmente las denominadas HMG, quedando insolubles tanto el DNA como las otras histonas. El material insoluble se separó por centrifugación en rotor GS-3 en una centrífuga Sorvall RC-5 a 3000 g durante 35 minutos, seguidamente el sobrenadante (material soluble en este medio) se clarificó a través de placa de vidrio poroso del número 4.

La histona H1 se precipitó del sobrenadante por adición de TCA 100% (p/v) hasta una concentración final del 18% (p/v). La histona H1 precipitada se recogió por centrifugación en una centrífuga Christ a 3000 rpm durante 40 minutos. El precipitado se la

vó de nuevo con TCA 18% (p/v) y después un lavado con acetona-HCl 0.2 %, seguido de cuatro lavados más con acetona. Los restos de acetona se eliminaron gaseando nitrógeno y secando posteriormente las histonas a vacío.

#### 2.2.3. PURIFICACION CROMATOGRAFICA DE LA HISTONA H1

Este método cromatográfico (Johns, 1964) se utilizó con objeto de purificar las histonas H1 obtenidas por el procedimiento descrito anteriormente.

Se empleó carboximetilcelulosa CM-52 Wathman dispuesta en una columna (50 cm x 1.9 cm) y equilibrada con una disolución tampón de ácido bórico 7 mM-hidróxido sódico 3 mM a pH 9.0. La elución de la muestra se llevó a cabo mediante un gradiente continuo y creciente formado a partir de 300 ml de la disolución tampón anteriormente citada y 300 ml de una disolución de NaCl 1 M en ése mismo tampón.

La muestra de proteína, 100 mg de histona H1 cruda, se aplicó disuelta en el primer tampón a una concentración de 5 mg/ml. Se recogieron fracciones de 2.5 ml cada 15 minutos, empleando un flujo de aproximadamente 10 ml/h.

Los resultados de la cromatografía se siguieron mediante la medida de la absorbancia en el ultravioleta, a 230 nm en un espectrofotómetro Varian modelo 635, de las diversas fracciones.

Las fracciones resultantes correspondientes a un mismo pico se reunieron y precipitaron conjuntamente con TCA 100% (p/v) hasta una concentración final del 18% (p/v) y después se siguió el mismo desarrollo que para la extracción de la histona H1 cruda, o bien se dializaron frente a agua destilada y se precipitaron con diez volúmenes de acetona, para seguir después idéntico proceso.

### 2.3. TECNICAS ANALITICAS

#### 2.3.1. ELECTROFORESIS

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida al 15% convencionales. Para su preparación y posterior desarrollo se siguió el procedimiento descrito por Panyim y Chalkley (1969).

La presencia de material proteico en los geles se detectó por teñido con una disolución de Negro Amido al 0.5 % (p/v) en ácido acético 1 N, lavando después repetidas veces con agua destilada para eliminar el colorante no fijado específicamente a proteínas. Los geles se acabaron de desteñir electroforéticamente.

#### 2.3.2. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES

Para el cálculo de los pesos moleculares se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, según el método puesto a punto por Shapiro et al. (1967) y modificado para el caso de las histonas por Panyim y Chalkley (1971).

#### 2.3.3. ANALISIS DE AMINOACIDOS

La determinación de la composición de aminoácidos de las diversas proteínas y péptidos se llevó a cabo como se expone a continuación.

Primeramente se sometió el material proteico a una hidrólisis ácida con HCl azeótropo 5.7 N, que contenía fenol al 0.1 % , en una concentración de 1 mg/ml durante 24 horas a 110°C. El proceso se realizó en tubos Pirex cerrados previamente a vacío. Una vez terminada la hidrólisis, se abrió el tubo, se desecó a vacío sobre hidróxido sódico y se dieron diversos lavados con agua destilada hasta la total eliminación del ácido clorhí-

drico. Con cada muestra se realizaron en todos los casos un mínimo de tres determinaciones.

A continuación se realizó una cromatografía de cambio de ión del residuo seco del hidrolizado en un analizador automático de aminoácidos Durrum D-500 provisto de un computador PDP-8 M que automáticamente realiza todas las operaciones de acuerdo con un programa previamente seleccionado.

El residuo seco del hidrolizado se disolvió en tampón citrato a pH 2.2, a una concentración de 1 mg/ml, antes de ser introducido en el analizador. El tiempo de duración del análisis fue de 80 minutos y el proceso de elución se realizó con disoluciones tampón de citrato sódico a valores de pH 3.25, 4.25 y 7.09. Finalizado el análisis, la resina se regeneró con lavados de NaOH 0.3 N conteniendo 0.25 g/l de EDTA.

La composición de aminoácidos en % molar se determinó a partir de los datos del análisis.

#### 2.3.4. DETERMINACION DEL RESIDUO N-TERMINAL

La determinación del aminoácido N-terminal se realizó por el método del cloruro de dansilo. Se disolvieron 1-3 nmoles de péptido en 100  $\mu$ l de agua bidestilada en un tubo Durham, tras lo cual se liofilizaron. Seguidamente se añadieron 5  $\mu$ l de  $\text{NaHCO}_3$  0.2 M y 5  $\mu$ l de una disolución de cloruro de dansilo en acetona (concentración de 5 mg/ml), se agitó la mezcla y se incubó a 40°C durante 1 hora. El color amarillo de la disolución debe desaparecer al incubarse. Posteriormente se secó a vacío sobre hidróxido sódico y una vez seco se añadieron 10  $\mu$ l de HCl 6 N conteniendo 0.1 % de fenol, se cerró a vacío y se incubó a 110°C durante 10-14 horas para que se dé la hidrólisis del DNS-derivado. Una vez acabada la hidrólisis, se abrió el tubo y se llevó de nuevo a sequedad sobre hidróxido sódico.

La identificación de los DNS-derivados se realizó en placas de poliamida (Cheng Chin Trading, Co. Taipei Taiwan) según el método de Summers et al. (1973). El residuo seco se disolvió en

1-2  $\mu$ l de piridina 50% (v/v) y se aplicó la muestra por ambos lados de la placa de poliamida. Por uno de los dos lados de la placa se aplicaron los patrones (DNS-Pro, DNS-Ile, DNS-Phe, DNS-Gly, DNS-Glu, DNS-Ser y DNS-Arg) en una concentración de 0.1 mg/ml de cada uno de ellos.

La placa se corrió durante 10 minutos en ácido fórmico al 1.5 % en agua, se secó perfectamente y se corrió después 15 minutos perpendicularmente a la primera dimensión en tolueno/ácido acético glacial (10:1 v/v). Todos los DNS-derivados, excepto DNS-Glu / DNS-Asp y DNS-Thr / DNS-Ser son resueltos en estos dos sistemas. Para resolver estos últimos se debe correr durante 15 minutos la placa, en el mismo sentido que la segunda dimensión, en un tercer sistema a base de acetato de etilo/metanol/ácido acético (20:1:1 v/v/v). Las ambigüedades que pudieran resultar de los derivados de los aminoácidos básicos se pueden resolver corriendo la placa por cuarta vez, en la misma dirección, en fosfato trisódico 0.05 M/etanol (3:1 v/v).

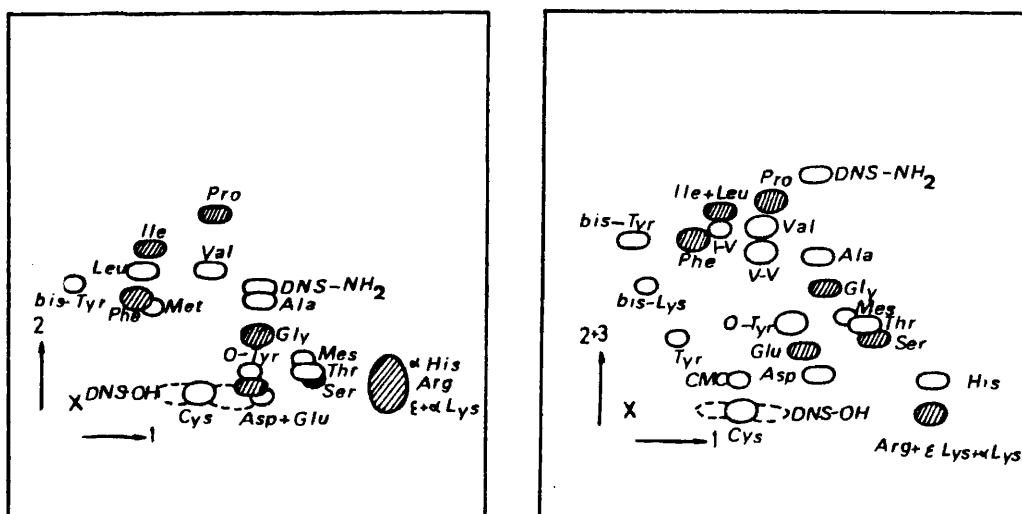


Figura 14. Identificación de los DNS-derivados.



## 2.4. HIDROLISIS QUIMICA DE LAS HISTONAS H1

### 2.4.1. TRATAMIENTO CON CNBr DE LA HISTONA H1 DE *C. CAPITATA*

El procedimiento seguido para este tratamiento es el descrito por Alfageme et al. (1974), si bien se introdujeron algunas variantes con objeto de optimizar el método en cuanto a temperatura y tiempo de tratamiento se refiere.

El proceso tuvo lugar en dos pasos. Primeramente se sometió a la histona H1 del insecto, previamente purificada, a un proceso de reducción, para lo cual se disolvió la proteína en ácido mercaptoacético 40% (v/v), agente reductor que evita que la metionina se oxide a metionina-sulfona a la vez que reduce los posibles puentes disulfuro, en una concentración de 4 mg/ml, permaneciendo a temperatura ambiente durante 18 horas. Después del tratamiento, la proteína se precipitó de la disolución adicionando 10 volúmenes de acetona-HCl 0.2%. Se lavó cinco veces con acetona seca y posteriormente se secó a vacío.

La segunda etapa comprende ya únicamente la degradación con CNBr propiamente dicha. La histona H1 del insecto reducida se disolvió en ácido fórmico 70% (v/v), a una concentración de 8-10 mg/ml. Una vez disuelta la histona, se añadió CNBr sólido en un exceso de 600 veces (mol/mol). El tratamiento se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno y en total ausencia de luz, durante 60 horas a una temperatura de aproximadamente 20°C. Después de esto, el ácido fórmico, el exceso de CNBr, así como otros productos volátiles de la reacción se eliminaron por liofilización.

En el caso del péptido resistente a la tripsina de *Ceratitis capitata* se siguió un proceso idéntico.

### 2.4.2. SEPARACION DE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DEL TRATAMIENTO CON CNBr DE LA HISTONA H1 Y EL PEPTIDO RESISTENTE A LA TRIPSINA

El producto del tratamiento de la histona con CNBr

se sometió a un proceso de separación y purificación de los péptidos resultantes por cromatografías sucesivas en una columna de Sephadex G-100 (100 cm x 18 cm) primero y Bio Gel P-100 (90 cm x 26 cm) en segundo lugar, previamente equilibradas con la disolución de elución, que en los dos casos fué HCl 0.01 N.

La proteína se aplicó disuelta en el eluyente a una concentración aproximada de 35 mg/ml. La elución se efectuó a un flujo de 20 ml/h. Se recogieron fracciones de 4 ml. y se valoró el material proteico en cada fracción midiendo la absorción a 230 nm. Las fracciones correspondientes a un mismo pico se juntaron y liofilizaron o bien se precipitaron con TCA 100% (p/v) hasta una concentración final del 18% (p/v), tras lo cual se lavaron con acetona-HCl 0.2% una vez, tres veces con acetona y se secaron a vac. Este último tratamiento se llevó a cabo en aquellas muestras que posteriormente se utilizaron para estudios de estructura secundaria y terciaria, ya que la liofilización induce estructura  $\beta$  en proteínas.

Los péptidos resultantes del tratamiento con CNBr de la región resistente a la tripsina (PRT) de la histona H1 de insecto se aislaron por cromatografía en Sephadex G-50 (120 cm x 1.7 cm) mediante un procedimiento similar.

#### 2.4.3. TRATAMIENTO CON N-BROMOSUCCINIMIDA DE LAS HISTONAS H1 DE TIMO DE TERNERA Y CERATITIS CAPITATA

El tratamiento de las histonas con N-Bromosuccinimida se realizó siguiendo el método de Bustin y Cole (1969). Las histonas se disolvieron en ácido acético 50% (v/v) a una concentración de 1.2  $\mu$ moles de proteína en 8 ml; a esta solución se le añadieron 12  $\mu$ moles de una solución preparada recientemente de N-Bromosuccinimida (17.8 mg/ml en ácido acético al 50% (v/v)). La reacción fué seguida espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Cary modelo 118, para lo cual se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción y su espectro se comparó con el de las alícuotas de una muestra control idéntica a la anterior, pero en la que no se

añadió proteína. Al cabo de tres horas, se realizó una segunda adición (12  $\mu$  moles) de una nueva solución idéntica de N-Bromosuccinimida preparada en el momento. Después de cuatro horas de la segunda adición, la mezcla de reacción se concentró en un rotavapor a 3 ml para la posterior separación de los péptidos resultantes.

#### 2.4.4. SEPARACION DE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DEL TRATAMIENTO CON NBS DE LAS HISTONAS H1

Para los productos resultantes de la degradación con NBS de las dos histonas H1 (de timo e insecto) se realizaron procesos idénticos y paralelos. La mezcla de reacción se aplicó en una columna de Sephadex G-100 (100 cm x 1.8 cm) previamente equilibrada con una solución de HCl 0.01 N. El material proteico se aplicó disuelto en el eluyente a una concentración de 24 mg/ml. La cromatografía se realizó a un flujo de 13 ml/h, siendo de 3 ml cada fracción recogida. La proteína se valoró en cada fracción por medida de la absorbancia a 230 nm. Las fracciones correspondientes a un mismo pico se juntaron y se realizó igual tratamiento que en el apartado 2.4.2.

#### 2.5. TRATAMIENTOS PROTEOLITICOS

##### 2.5.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS PEPTIDOS RESISTENTES A LA DIGESTION TRIPTICA

Los péptidos resistentes a la digestión triptica (PRTs) de ambas histonas, timo de ternera y *Ceratitidis capitata*, los cuales contienen la región globular de las moléculas intactas, se prepararon utilizando una modificación del método de Hartman et al. (1977). Las histonas se disolvieron en tampón NaCl 1.0 M-fosfato sódico 0.3 M a pH 8.0 y a una concentración de 10 mg/ml. A la disolución de proteína se añadió tripsina

(Northington), tratada con TPCK ( 1 tosilamido-2 fenil-etil-cloro-etilcetona), inhibidor de la actividad quimotriptica, hasta obtener una proporción enzima/histona de 1:1000 (p/p) y la solución se incubó a temperatura constante de 22°C. Bajo estas condiciones, el tiempo óptimo de digestión resultó ser 60 minutos para la histona de timo y de 90 minutos para la histona de insecto (ver resultados).

El transcurso de la reacción se siguió sacando alícuotas a diferentes tiempos que eran corridas en electroforesis en geles de poliacrilamida.

La reacción se detuvo por adición de TLCK hasta conseguir una relación inhibidor/enzima de 2:1 (p/p). Seguidamente se añadió TCA 100% (p/v) hasta una concentración final de 18% (p/v), el precipitado resultante se centrifugó, se lavó una vez con TCA 18% (p/v), una vez con acetona-HCl 0.2% y tres veces con acetona. El precipitado final, que es el péptido resistente a la tripsina, se secó a vacío y se purificó por cromatografía en Sephadex G-75 de acuerdo con Hartman et al. (1977).

#### 1.5.2. HIDROLISIS TRIPTICA

Este tratamiento se realizó con diferentes muestras H1 de insecto y timo, PRT de insecto y timo, péptido de mayor tamaño molecular resultante del tratamiento con CNBr de la histona H1 de insecto ( $PG_{CNBr}$ ) y péptido de mayor tamaño molecular resultante del mismo tratamiento del PRT de insecto ( $PG_{CNBr}PRT$ ), con el fin de obtener los correspondientes mapas tripticos de las diferentes regiones de la molécula.

Las muestras fueron disueltas en agua bidestilada a una concentración de 0.8 mg/0.05-0.02 ml. A continuación se añadieron 60  $\mu$ l de un tampón de N-metilmorfolina 0.2 M para llevar la solución de proteína a pH 8.0 (para este tampón se utilizó N-metilmorfolina bidestilada sobre ninhidrina con el fin de eliminar interferencias a la hora de revelar los mapas tripticos).

Se añadieron después 10  $\mu$ l de una disolución de tripsina, tratada con TPCK, (1 mg/ml) con lo que la relación tripsina/histona fué de 1:80. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 4 horas, controlando el pH cada cierto tiempo, aunque prácticamente se mantuvo constante durante toda la incubación. Después de este tiempo, la muestra se llevó a sequedad en un desecador y finalmente se disolvió en el medio apropiado para la resolución del mapa triptico correspondiente.

#### 2.5.3. HIDROLISIS QUIMOTRIPTICA

Este tratamiento se llevó a cabo con la histona H1 de *Ceratititis capitata* con objeto de establecer la posible existencia de sitios de rotura específica de la proteasa comparables a los existentes en la H1 de timo de ternera (Bradbury et al., 1975b). Por ello se realizó en idénticas condiciones que las empleadas para la obtención del PRT (ver apartado 2.5.1.). La quimotripsina empleada fué tratada previamente con TLCK (N- $\alpha$ -tosil-L-lisil-clorometano), inhibidor de la actividad triptica. En este caso la relación quimotripsina/histona utilizada fué 1:1000. La reacción se llevó a cabo durante tres horas, tomando alícuotas a diferentes tiempos y realizando electroforesis de las mismas en geles de poliacrilamida.

#### 2.5.4. HIDROLISIS CON TROMBINA

La hidrólisis con trombina de las histonas H1 de timo de ternera y *Ceratititis capitata* se realizó según el método puesto a punto por Chapman et al. (1976).

Las muestras de histona se disolvieron en un tampón Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM pH 8.0 a una concentración aproximada de 18 mg/ml. La trombina sólida (Sigma 850-1) se añadió a la disolución de histona (100 N.I.H. unidades por cada 100 mg de histona) y se incubó la mezcla de reacción durante 4 horas a 37°C en baño de agua. A diferentes tiempos de incubación se reco

geron alícuotas que se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida, con el fin de observar las posibles semejanzas y diferencias entre las digestiones con el enzima de ambas histonas.

Después de las 4 horas, la mezcla de reacción se aplicó en una columna de carboximetilcelulosa (40 cm x 1.8 cm) y fue eluida con un litro de un gradiente lineal de NaCl 0.2 M a NaCl 1.0 M en tampón fosfato 50 mM pH 6.8 tal y como se describe por Chapman et al. (1976). Las fracciones resultantes se recogieron y valoraron igual que en los casos anteriores. Los picos se precipitaron con TCA 100% (p/v) hasta una concentración final de 10% (p/v) y se siguió igual tratamiento que en el apartado 2.5.1.

## 2.6. MAPAS TRIPTICOS

El procedimiento que se siguió para la obtención de los mapas tripticos de los diferentes péptidos y proteínas hidrolizados se detalla a continuación.

Una vez realizada la digestión con la enzima del correspondiente péptido o proteína y llevada a sequedad tal y como se ha indicado en el apartado 2.5.2., la muestra se disolvió en 40 µl de agua bidestilada; 10 µl de esta disolución se aplicaron sobre una placa de celulosa CEL 300 de 0.1 mm de espesor, en un punto de la placa situado a 4.5 cm aproximadamente de cada lado. En posición simétrica al otro lado de la placa y en el sentido de desarrollo de la electroforesis, se aplicó una disolución de bis-dinitrofenil-lisina y negro amido que sirvieron de referencia del avance. A continuación la placa se humedeció en tampón piridina/ácido acético/acetona/agua (40:80:300:1520), pH 4.4, teniendo cuidado para que la línea aplicación-marcador sea la línea de coincidencia de los frentes de difusión de la placa. La placa, así humedecida, se sometió a electroforesis en una cámara de electroforesis "Desaga", durante 2 horas a 400 V en corriente continua. Para evitar un sobrecalentamiento, durante toda la elec

troforesis se mantuvo refrigeración de la cámara por un baño de agua.

Una vez acabada la electroforesis se dejó secar la placa en una campana de extracción durante al menos 6 horas. A continuación se realizó una cromatografía en dirección perpendicular a la seguida en la electroforesis. El sistema empleado para el desarrollo cromatográfico fue piridina/ácido acético/agua/n-butanol (BAWP, 50:15:60:75). La cromatografía se desarrolló durante aproximadamente 6 horas, tiempo necesario para que el frente recorra toda la longitud de la placa. Finalizada la cromatografía, se dejó secar la placa durante 12 horas.

Los reactivos empleados en la realización de los dos procesos han de ser de extrema pureza, con el fin de que no existan contaminantes que puedan inducir a error en el revelado de la placa. Para este revelado se roció la placa con una disolución de ninhidrina (1 g/l) en ácido acético/etanol (50:450).

En el caso del PRT de *Ceratitidis capitata*, una vez revelados los péptidos y por su interés comparativo, se rascan con una espátula y se depositaron los péptidos iguales de tres mapas trípticos en un mismo tubo (Eppenderf-Hamburg RFA). Los péptidos se extrajeron dos veces en 100-200 µl de HCl 6 N-0.02% β-mercaptoetanol con agitación durante 20-30 minutos. Los tubos se centrifugaron en centrífuga de mesa y el sobrenadante se traspasó a tubos Pirex de hidrólisis, tras lo cual se hidrolizaron y se determinó la composición de aminoácidos de cada péptido.

## 2.7. MODIFICACIONES COVALENTES

### 2.7.1. CARBOXIMETILACION DE LA HISTONA H1 DE CERATITIS CAPITATA Y SU CORRESPONDIENTE PRT

Para la carboximetilación del único residuo de cisteí

na que contiene la H1 de insecto (que está presente en el PRT), se siguió el procedimiento utilizado por Craven et al. (1965). Se disolvieron 20 mg de histona en 4 ml de  $\text{GuCl}$  6 M-Tris 0.3 M pH 8.0. A esta solución se le añadieron 7.5  $\mu\text{moles}$  de ditioneitol. Se gaseó con nitrógeno y se incubó durante una hora a  $40^{\circ}\text{C}$ , en la oscuridad. Posteriormente se añadieron 75  $\mu\text{moles}$  de iodoacetato, tras lo cual se gaseó nuevamente nitrógeno. La solución se agitó ininterrumpidamente en un Vortex. Al concluir la agitación se añadieron 300  $\mu\text{moles}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, que contrarresta la acción del exceso de iodoacetato. Finalmente y ya en presencia de luz, se eliminaron los reactivos por diálisis frente a agua destilada a  $4^{\circ}\text{C}$ . El medio de diálisis se renovó cuatro o cinco veces durante las veinticuatro horas de la diálisis. La proteína carboximetilada se recuperó por precipitación con TCA 100% (p/v) hasta una concentración final de 18% (p/v). Tras lo cual se realizó el mismo proceso de lavados sucesivos y secado a vacío que en los apartados anteriores.

Anteriormente al tratamiento descrito es preciso efectuar una purificación del iodoacetato por recristalización con pentano o hexano en completa oscuridad.

#### 2.7.2. NITRACION

La nitración de las histonas H1 de insecto y timo y sus correspondientes PRT se realizó indistintamente en tampón fosfato sódico 0.3 M-NaCl 1.0 M pH 8.0 y en  $\text{GuCl}$  6 M-Tris 0.3 M pH 8.0, incubando las muestras en presencia del reactivo (tetranitrometano) en un exceso cuatro veces molar sobre el número de tirosinas de la muestra y a temperatura ambiente. Sobre la disolución de proteína en cada uno de estos dos tampones se añadió el agente en forma de solución 0.1 M en etanol al 95% (v/v). El transcurso de la reacción se siguió midiendo la absorción a 428 nm (longitud de onda a la que la nitrotirosina presenta un máximo característico en estas condiciones de pH), hasta que el valor de la absorción a esta longitud de onda llegó a un valor prácticamente constante. Posteriormente,



las muestras se precipitaron, se lavaron y se secaron a vacío como se ha descrito en el apartado anterior. El residuo seco se aplicó en una columna de Sephadex G-50 (100 cm x 2.0 cm) en HCl 0.01 N. Finalizada la cromatografía los picos se valoraron y precipitaron como se ha descrito en apartados anteriores. Seguidamente, se procedió a la electroforesis de los picos en geles de poliacrilamida tal y como se describe en el apartado 2.3.1. Este tratamiento cromatográfico se llevó a cabo para separar el monómero de la proteína nitrada de los posibles dímeros formados en el proceso de nitración.

El cálculo del porcentaje de nitración se realizó utilizando un coeficiente de extinción molar para la nitrotirosina a 428 nm de  $4200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Glazer et al., 1975) si bien teniendo presente que únicamente el 86% de la absorción registrada a esa longitud de onda corresponde a nitrotirosina, siendo el 14% restante debido a nitroformiato originado como subproducto de la reacción (Bustin, 1971). También se realizó este cálculo por la desaparición del pico de tirosina en el análisis de aminoácidos de las muestras nitradas, suponiendo dos restos de fenilalanina para la H1 de insecto y uno para la H1 de timo.

## 2.8. TECNICAS ESPECTROSCOPICAS

### 2.8.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro Cary modelo 118. La absorción y la primera derivada se recogieron rutinariamente desde 350 nm hacia longitudes de onda menores y desde 550 nm para las correspondientes muestras nitradas. La mayor parte de las muestras no exhibieron turbidez, como se pone de manifiesto por la absorción despreciable que tenían las mismas entre 350-310 nm. En cambio, en algunos casos sí existía un aparente incremento de la absorción entre 350-310 nm, debido a la turbidez de la muestra. La dispersión se corrigió entonces, de acuerdo

con el método de Donovan (1973). La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente en HCl 0.01 N a cuatro longitudes de onda, 205, 210, 215, 225 nm ( $E_{205}^{1\%} = 310$ ;  $E_{210}^{1\%} = 205$ ;  $E_{225}^{1\%} = 1/144$ ). Los espectros de diferencia de las histonas y sus PRTs inducidos por sal se registraron entre un rango de concentración de  $(3.5-9.0) \times 10^{-5}$  M en proteína, dependiendo del peso molecular del péptido o proteína. Las muestras se disolvieron en agua destilada a pH 6.0; dos alícuotas, perfectamente medidas, de 3 ml se llevaron a dos células de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Las líneas bases disolvente-disolvente y proteína-proteína fueron idénticas, demostrando así que la absorción de las muestras era suficientemente baja para que el fotomultiplicador diera una respuesta adecuada. Sobre la primera cubeta se añadieron alícuotas de una disolución de KF 0.3 M con una microjeringa. Sobre la segunda célula, que se utilizó como referencia, se añadieron alícuotas idénticas de agua destilada. En el caso de los experimentos con SDS las alícuotas añadidas en la primera célula fueron de una disolución de SDS 1% (p/v) y en la segunda asimismo de agua destilada.

Los espectros se realizaron a 22°C y a una sensibilidad de 0.05 - 0.1 unidades de absorbancia, con programa automático de variación de abertura de rendija. Para obtener los espectros de diferencia con el pH, las muestras se disolvieron en agua destilada o en SDS 0.05% (p/v) según los casos a pH 3.0, en un rango de concentración idéntico al anterior. El pH de las muestras se obtuvo por adición de alícuotas de 3  $\mu$ l de NaOH 2, 0.5 ó 0.1 N, dependiendo del rango de pH. Se añadieron alícuotas idénticas de agua destilada en la célula de referencia y el espectro se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. El rango de sensibilidad empleado fue de 0.2-0.5 unidades de absorbancia entre 350-260 nm y de 1-2 unidades de absorbancia entre 260-230 nm.

## 2.8.2. DICROISMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular se llevaron a ca-

bo en un dicrógrafo (Jobin-Yvon) Mark III. Para la obtención del espectro en la región del ultravioleta próximo (340-245 nm), se utilizaron células de 1 cm de paso óptico y se realizó a una sensibilidad de  $1 \times 10^{-6} \Delta A \text{ mm}^{-1}$ . La anchura de rendija empleada fué de 2 nm en todos los casos. Los espectros en la región del ultravioleta lejano (250-190 nm) se realizaron utilizando células de 0.05 cm de paso óptico y se usó una sensibilidad de  $5 \times 10^{-6} \Delta A \text{ mm}^{-1}$ .

La fuerza iónica, concentración de SDS y pH se ajustaron como se ha indicado en el apartado anterior. Las medidas en el ultravioleta próximo se realizaron con la proteína disuelta a concentraciones entre  $3.5\text{-}9.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ , mientras que en el ultravioleta lejano se trabajó con disoluciones diez veces más diluidas. Los resultados se expresan en elipticidades molares con dimensiones de grados  $\times \text{cm}^2 \times (\text{dmol de residuo})^{-1}$  en el ultravioleta lejano y grados  $\times \text{cm}^2 \times (\text{dmol de proteína})^{-1}$  en el ultravioleta próximo. En la estimación de las contribuciones de  $\alpha$ -hélice, estructura  $\beta$  y cadena estadística se utilizó el método de Chen et al. (1972) modificado por Montero y Morán (Comunicación personal) y mediante un ajuste iterativo con un programa Fortran IV llevado a cabo en un computador IBM sistema/360.

### 2.8.3. FLUORESCENCIA

Los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Fica 55 MK II, equipado con una lámpara de Xenon de 450 watios, utilizando una anchura de rendija de 2.5 y 7.5 nm para los haces de excitación y emisión respectivamente. Los espectros de emisión se registraron utilizando una longitud de onda de excitación de 276 nm, mientras que los espectros de excitación de las diferentes muestras se realizaron utilizando unas longitudes de onda fijas de emisión de 300 y 340 nm. Los espectros se recogieron en un XY Ohnigrafic 200 a una velocidad aproximada de 10 nm/minuto. Todas las disoluciones de proteína empleadas se centrifugaron y se filtraron a través de millipore (5 micras), previamente a su estudio espectrofluorimétrico. Se emplearon células de cuarzo de 5

mm de paso óptico. La temperatura a la que se registraron los diferentes espectros se mantuvo constante a 20°C mediante termostatación del portacubetas por medio de un baño Lauda. La concentración de la muestra se determinó espectrofotométricamente, observando siempre que la absorción efectiva a la longitud de onda de excitación sea inferior a 0.05, a fin de evitar errores de filtro interno.

## 2.9. SECUENCIA AUTOMATICA

Previamente a la secuenciación del PRT y PG<sub>CNB</sub> de la histona H1 de *Ceratitidis capitata* se realizó un tratamiento de oxidación de las muestras con ácido perbórmico, con el fin de evitar la posible formación de enlaces disulfuro intermoleculares.

Para ello, 300 nmoles de la muestra se disolvieron en 150 µl de ácido fórmico 99% (v/v) y se dejó en reposo en hielo durante una hora. Después de este tiempo se añadieron a la disolución de proteína 180 µl de una disolución de ácido perbórmico preparada recientemente (0.9 ml de ácido fórmico 99% (v/v) y 0.5 ml de agua oxigenada 30% (100 volúmenes)), que se había mantenido 2.5 horas a 0°C. La disolución de proteína en ácido perbórmico se tapó y se mantuvo 2.5 horas a 0°C. Posteriormente las muestras se liofilizaron.

La secuencia parcial se llevó a cabo por degradación automática Edman en un secuenciador automático Beckman modelo 890-B con un programa de aplicación 031371 y un programa de secuencia "Protein Quadrol" 060275 de la casa comercial Beckman.

La identificación de los PTH-derivados se realizó manualmente utilizando indistintamente tres métodos de detección: hidrólisis en HCl 6 N en presencia de SnCl<sub>2</sub> 0.1% a 130°C durante 6 horas (Méndez y Lai, 1975), por cromatografía en placas de sílica gel (Merck, Darmstadt, R.F. Alemana) según el método de Withmann-Liebold et al. (1975) y por cromatografía en placas de poliamida (Cheng, Chin, Trading Co, Taipei, Taiwan) según el procedimiento de Summers et al. (1973).

Para la identificación de ciertos PTH-derivados (PTH-His y PTH-Arg) se realizó asimismo un cuarto método, revelando una aplicación de los PTH-derivados correspondientes sobre papel Whatman n°1 con reactivo de Pauly para PTH-His y fenantrenoquinona (Yamada e Itano, 1966) para PTH-Arg.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

### 3.1. ESTRUCTURA PRIMARIA

Los estudios de estructura primaria en las histonas muy ricas en lisina, H1 y H5, tienen un enorme interés, debido a la alta conservatividad que presentan estas proteínas cromosomales y a su importante función estructural en el mantenimiento de la estructura de la cromatina. Recientemente, las secuencias completas y parciales, obtenidas de diferentes histonas muy ricas en lisina de diferentes organismos, han revelado la presencia de una región muy conservativa e hidrofóbica en la molécula y a esta región se le ha adjudicado un papel esencial en la estabilización del nucleosoma.

Sin embargo, esta conservatividad postulada para el dominio central de esta clase de histonas está basada en las secuencias conocidas de un pequeño número de histonas H1 y H5, por lo que existe una gran necesidad de ampliar esta información en una mayor cantidad de organismos.

En este tipo de estudios, se hace necesaria la escisión de la molécula de histona en fragmentos de menor tamaño molecular, sobre todo si, como se pretendió en este caso, se trata de obtener información de una cierta región de la misma. Para ésto, son fundamentales las hidrólisis, tanto químicas como enzimáticas, que presenten un grado de especificidad y rendimiento adecuados, y a veces una combinación de ambas técnicas. El CNBr y la NBS son dos agentes químicos que presentan estos requisitos y por ello se les ha empleado preferentemente. Las hidrólisis enzimáticas se llevaron a cabo con tripsina, quimotripsina y trombina principalmente, por su interés comparativo con timo y aprovechando los datos que existen sobre este punto en la bibliografía.

Por otra parte, los resultados obtenidos de estas hidrólisis químicas y enzimáticas de la histona H1, ofrecen, no solamente un método para abordar la estructura primaria de la molécula, sino que también ayudan a interpretar los resultados obtenidos por otras técnicas sobre niveles estructurales superiores de la proteí

na como se discutirá posteriormente.

3.1.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS PEPTIDOS RESISTENTES  
A LA TRIPSINA DE LAS HISTONAS H1 DE TIMO DE TERNERA Y  
CERATITIS CAPITATA

La digestión triptica de las histonas se llevó a cabo como se detalló en el apartado 2.5.1.

La figura 15 muestra el transcurso con el tiempo de la digestión triptica controlada de las histonas H1 de timo de ternera e insecto. Durante los primeros minutos de la reacción van apareciendo grandes fragmentos de las histonas, que posteriormente son hidrolizados a un péptido resistente de menor tamaño.



Figura 15. Separación electroforética de los fragmentos obtenidos por digestión triptica controlada de las histonas H1 de timo de ternera (b-e) y *Ceratitidis* (g-k). Las alícuotas se tomaron de la mezcla de reacción a (b y g) 6, (c y h) 35, (d e i) 60, y (e y j) 90 minutos. Los gels a y f muestran la imagen electroforética de H1 intacta de timo de ternera y *Ceratitidis* respectivamente. El gel k muestra la imagen del PRT de insecto purificado por cromatografía en gel.



Este procedimiento fué descrito por Hartman et al. (1977) para la histona H1 de timo. El péptido resistente (PRT) de la histona H1 de insecto, que al principio de la reacción ya aparece en el gel, llega a ser la banda mayoritaria a los 60 minutos de la digestión (Figura 15i), sin embargo se continuó la digestión durante 30 minutos más, siendo la única banda visible a los 90 minutos de incubación (Figura 15j).

Los posibles péptidos de bajo peso molecular que pudieran estar presentes a los 90 minutos de digestión se eliminaron, primero por un proceso de precipitación selectiva con TCA 18%, seguido de cromatografía en Sephadex G-75. La muestra así purificada aparece como una única banda en electroforesis en idénticas condiciones (Figura 15k).

La movilidad electroforética del péptido resistente de la histona de insecto es ligeramente menor que la de su homólogo de timo. Posiblemente este hecho sea resultado de la diferencia en peso molecular existente entre ambos. Estos pesos moleculares, determinados por electroforesis en presencia de SDS, resultaron ser de 9800 para el PRT de timo y de 10100 para el correspondiente de *Ceratitidis capitata*.

La composición de aminoácidos de ambos péptidos resistentes se observa en la Tabla II. La composición del PRT de timo es prácticamente idéntica a la obtenida por Hartman et al. (1977) para el fragmento que ellos denominaron "Tr-Tr", siendo probablemente la misma región de la histona H1 de timo de ternera.

Como ya se había demostrado, la H1 de insecto posee cisteína, metionina e histidina, a diferencia de su homóloga de timo (Franco et al., 1977). Todos estos aminoácidos están presentes en el PRT, como se observa en la Tabla II. Además de estos residuos, existen otras diferencias entre los péptidos resistentes de ambas histonas. El de *Ceratitidis* contiene menos glicocola y leucina y más isoleucina y tirosina (dos residuos). A pesar de estas diferencias, las composiciones de ambos péptidos son muy similares y la mayor parte de las diferencias encontradas entre las moléculas intactas (Franco et al., 1977) deben encontrarse en las regiones N

TABLE II: Composición de aminoácidos de los péptidos resistentes a la tripsina de las histonas H1 de *Ceratititis capitata* y timo de ternera.

Aminoácido	<i>Ceratititis</i>	Timo
Acido Aspártico	5.9	6.1
Treonina	6.8	5.5
Serina	10.6	10.6
Acido Glutámico	6.8	7.6
Prolina	5.9	4.7
Glicocola	6.2	11.7
Alanina	16.5	16.2
Cisteína <sup>a</sup>	0.7	0.0
Valina	6.7	6.7
Metionina	0.7	0.0
Isoleucina	5.6	2.3
Leucina	6.6	9.5
Tirosina	2.0	1.0
Fenilalanina	2.0	1.4
Lisina	13.2	14.4
Histidina	1.1	0.0
Arginina	2.5	2.4

<sup>a</sup> Determinado como carboximetilcisteína.

y C-terminales.

Es importante resaltar que es la primera vez que se obtiene un péptido de características similares al de la histona de mamíferos en una histona H1 de insectos. Esta paralela correlación en el método de aislamiento debe ser reflejo de una similar estructura tridimensional, la cual le concede esa especial protección a la proteólisis y que lleva consigo una alta especificidad en esa estructura terciaria, ya que cuando la histona se modifica por nitración (de las tirosinas) o carboximetilación (del residuo de cisteína) no se obtiene péptido resistente análogo al anterior.

### 3.1.2. TRATAMIENTO CON CNBr DE LA HISTONA H1 DE CERATITIS CAPI-TATA

El tratamiento con CNBr de la histona H1 de insecto produce la división de la molécula en dos fragmentos, debido a la existencia de un único residuo de metionina en su estructura primaria. La mezcla de reacción se sometió a cromatografía en Sephadex G-100 tal y como se indicó en el apartado 2.4.2. Se obtuvieron cuatro picos (figura 16). El primero de éstos (denominado S-1) contiene agregados de alto peso molecular, histona intacta y un péptido de mayor movilidad electroforética que ésta, fundamentalmente (Figura 17c). El segundo pico, S-2, contiene histona intacta y mayoritariamente un péptido resultante del tratamiento con el agente; este último es prácticamente el único visible en el pico S-3 (fi-gura 17d y 17e) y corresponde al fragmento de mayor tamaño produc-to de la rotura ( $PG_{CNBr}$ ). El cuarto y último pico de la cromatogra-fía (S-4) contiene una serie de péptidos de mayor movilidad electroforética, algunos de ellos resultantes de hidrólisis ácida parcial de la proteína que, como ya se ha comprobado, tiene lugar en el me-dio de reacción (Barbero, 1978).

Con objeto de obtener una mayor pureza y rendimiento del  $PG_{CNBr}$ , el pico S-2 (por otra parte el mayoritario en peso) se sometió a una nueva cromatografía en Bio Gel P-100. Esta vez se obtuvieron dos picos (Figura 18). EL pico BG-1 migra en electrofore-

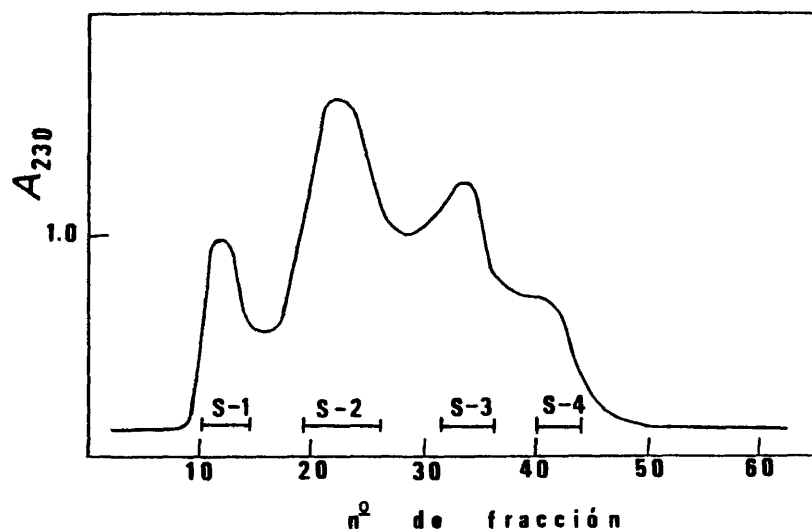


Figura 16. Perfil de elución de la cromatografía en Sephadex G-100 de los productos resultantes del tratamiento con CNBr de la H1.

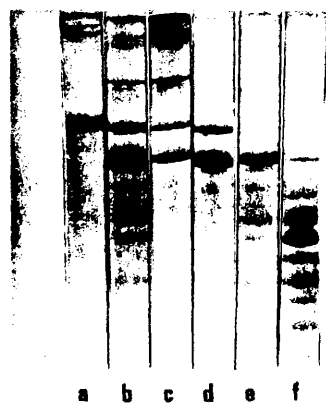


Figura 17. Electroforesis de los picos obtenidos en la cromatografía. (a) histona H1 de insecto, (b) productos resultantes del tratamiento con CNBr de la H1, (c) pico S-1, (d) pico S-2, (e) pico S-3, mayoritariamente PG<sub>CNB</sub>, (f) pico S-4.

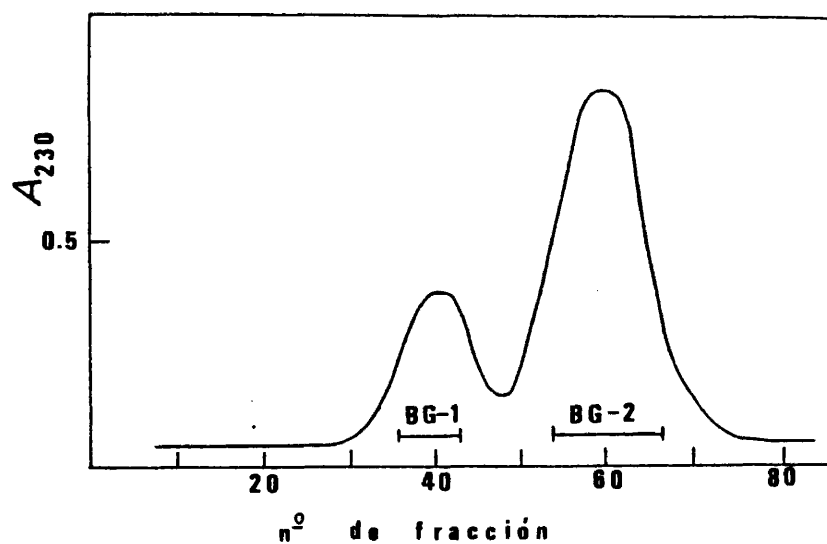


Figura 18. Perfil de elución de la cromatografía en Bio Gel P-100 del pico S-2.

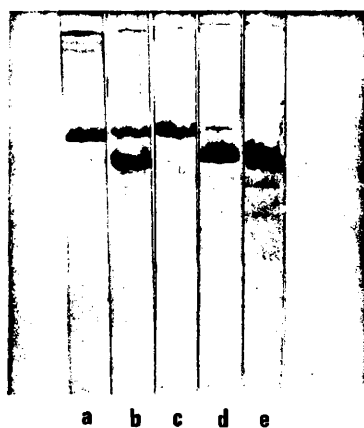


Figura 19. Electroforesis de los picos resultantes de la cromatografía. (a) H1 intacta, (b) pico S-2, (c) pico BG-1, (d) intermedio picos BG-1 y BG-2, (e) pico BG-2.

sis igual que la molécula intacta de histona (Figura 19c). El pico BG-2 tiene la misma movilidad electroforética y análisis de aminoácidos que el pico S-3 de la cromatografía anterior y corresponde al  $PG_{C_{NB}}$  (Figura 19e).

La composición de aminoácidos del pico S-4 (Tabla III) muestra la presencia de metionina en sus dos formas, homoserina y homoserina lactona, indicando que en este pico está contenido el fragmento restante N-terminal producto de la escisión con CNBr y que he denominado  $PP_{C_{NB}}$ .

La composición del  $PG_{C_{NB}}$  (Tabla III) revela la presencia de tirosina y de un mayor contenido en lisina que la molécula intacta, claro reflejo de que este péptido contiene la región C-terminal, muy básica, de la molécula. Posee también fenilalanina pero no contiene histidina. El peso molecular estimado para el  $PG_{C_{NB}}$  por electroforesis en geles de poliacrilamida- SDS resultó ser 18700. Teniendo este dato en cuenta, la metionina debe encontrarse en la mitad N-terminal de la molécula de histona, aproximadamente alrededor de los residuos 35-50 de la estructura primaria de la molécula. La presencia de agregados de  $PG_{C_{NB}}$ , de alto peso molecular en los geles de electroforesis, hace suponer que este péptido contiene el residuo de cisteína (Barbero, 1978).

Tiene particular interés comparar estos resultados con los obtenidos por Alfageme et al. (1974) en H1 de *Drosophila melanogaster*. El mismo tratamiento con CNBr en esta histona produce dos péptidos de tamaños moleculares aproximados a los de la H1 de *Ceratitis capitata*. La composición de aminoácidos del  $PG_{C_{NB}}$  de *Drosophila* resulta muy similar a la de su homólogo en *Ceratitis* contiene 2 tirosinas y 2 fenilalaninas. Esta identidad en composición de aminoácidos probablemente refleje una similitud en estructura primaria.

### 3.1.3. TRATAMIENTO CON CNBr DEL PRT DE CERATITIS CAPITATA

El único residuo de metionina que contiene la histona de insecto se encuentra presente en el PRT, como ya se comentó,

TABLA III: Composición de aminoácidos de los péptidos resultantes del tratamiento con CNBr de la H1 de *Ceratitidis capitata*.

Aminoácido	H1 C.c.	H1 D.m	PG <sub>CNB</sub> C.c.	PG <sub>CNB</sub> D.m.	Pico S-4
ASX	4.7	4.3	3.6	3.9	6.2
THR	7.0	7.4	6.9	6.1	8.2
SER	11.5	9.8	11.5	7.7	9.6
HOMOSER	-	-	-	-	Trazas
GLX	4.9	5.6	5.9	3.4	5.4
PRO	5.1	5.6	3.6	4.6	12.7
GLY	7.5	5.3	8.6	5.3	3.5
ALA	16.7	19.0	17.4	19.9	19.8
CYS	0.5 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
VAL	5.2	7.3	4.1	6.4	11.0
MET	0.5	0.4	0.0	0.0	0.0
ILE	2.8	3.4	2.2	3.7	3.2
LEU	3.5	3.5	3.9	3.9	0.9
TYR	1.3	1.3	1.3	1.4	Trazas
PHE	0.8	0.9	1.1	1.4	0.0
LYS	25.1	24.6	28.5	31.1	16.6
HIS	0.7	0.6	0.0	0.0	2.1
ARG	1.7	1.2	1.0	0.7	0.8
<u>BASICOS</u> <u>ACIDOS</u>	2.8	2.7	3.1	4.1	1.7

<sup>a</sup> Determinado como carboximetilcisteína

<sup>b</sup> ND no determinado

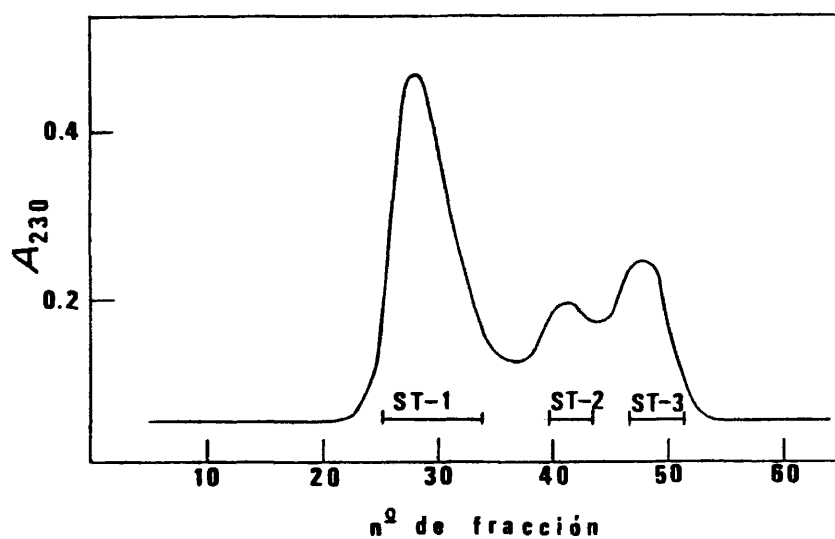


Figura 20. Perfil de elución de la cromatografía en Sephadex G-50 de los productos resultantes del tratamiento con CNBr del PRT.



Figura 21. Electroforesis de los picos de la cromatografía. (a) H1 intacta, (b) PRT de insecto, (c) productos resultantes del tratamiento con CNBr del PRT, (d) pico ST-1, (e) pico ST-2.



TABLA IV: Composición de aminoácidos de los péptidos resultantes del tratamiento con CNBr del PRT de *Ceratititis capitata*.

Aminoácido	PRT	PG <sub>CNB</sub> -PRT (Pico ST-1)	PP <sub>CNB</sub> -PRT (Pico ST-3)
ASX	5.9	5.1	4.6
THR	6.8	6.0	10.5
SER	10.6	12.4	9.3
HOMOSER	-	-	Trazas
GLX	6.8	6.0	12.4
PRO	5.9	3.7	14.1
GLY	6.2	9.0	4.5
ALA	16.5	14.4	15.9
CYS	0.7 <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
VAL	6.7	3.1	3.0
MET	0.7	0.0	0.0
ILE	5.6	6.6	5.4
LEU	6.6	9.9	2.1
TYR	2.0	2.7	1.0
PHE	2.0	2.6	0.7
LYS	13.2	16.6	8.1
HIS	1.1	0.6	5.0
ARG	2.5	3.4	1.7

<sup>a</sup> Determinado como carboximetilcisteína

<sup>b</sup> ND no determinado

por lo que el tratamiento de este péptido con CNBr da como resultado la obtención de dos fragmentos de esta región de la molécula, muy útiles en orden a determinar algunas características particulares de esta zona hidrofóbica, resistente a la tripsina.

En la figura 20 se muestra el resultado de la separación de ambos péptidos por cromatografía en Sephadex G-50. El pico ST-1 mueve en electroforesis como dos bandas, una de ellas de idéntica migración al PRT intacto, y la segunda, mucho más intensa, de mayor movilidad, que corresponde al péptido de mayor tamaño resultante del tratamiento ( $PG_{C_{NB}}$ -PRT) como se muestra en la figura 21. El pico ST-3 no se tiñe en electroforesis en las mismas condiciones, posiblemente debido a su bajo peso molecular, pero sí se puede detectar por electroforesis en placas de poliamida, moviendo como un único péptido capaz de teñirse con ninhidrina.

La composición de aminoácidos de los picos ST-1 y ST-3 se muestra en la Tabla IV. La presencia de homoserina y homoserina lactona en el pico ST-3 indica que este péptido corresponde a la región amino-terminal del PRT. A juzgar por la movilidad electroforética del pico ST-1, la metionina debe encontrarse entre los 15 primeros residuos del PRT. La banda que, mayoritariamente, constituye el pico ST-1 ( $PG_{C_{NB}}$ -PRT), contiene los dos restos de tirosina pero no contiene histidina, confirmándose así que este residuo se encuentra asimismo muy cercano al N-terminal del PRT. Por otra parte, el elevado porcentaje de prolina del pico ST-3 ( $PP_{C_{NB}}$ -PRT), así como su bajo contenido en residuos hidrofóbicos, hace pensar que este péptido debe contribuir muy poco a la estructura secundaria del PRT.

#### 3.1.4. TRATAMIENTO CON NBS DE LAS HISTONAS H1 DE TIMO DE TERNERA Y CERATITIS CAPITATA

El único residuo de tirosina existente en H1 de timo de ternera es susceptible de reaccionar con NBS, dando origen a dos fragmentos de la molécula, 1-72 y 72-C-terminal (Bradbury et al., 1975a). Los resultados obtenidos con la histona de timo es-

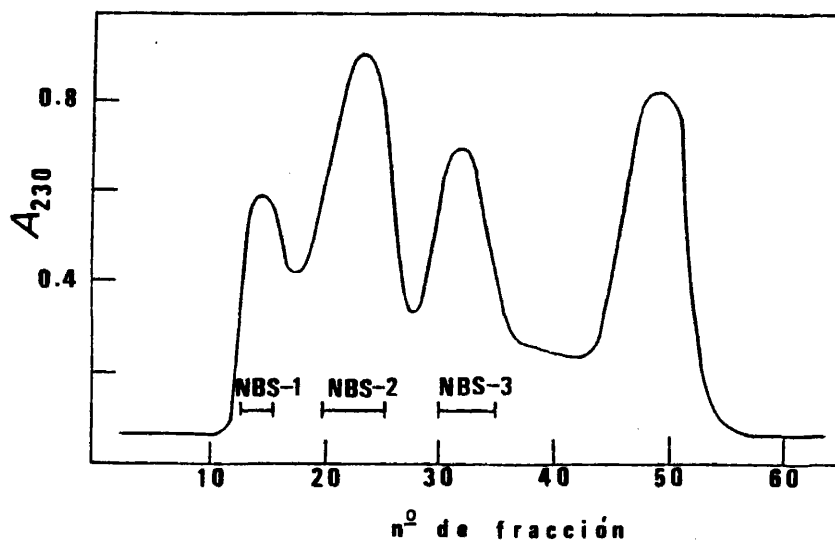


Figura 22. Perfil de elución de la cromatografía en Sephadex G-100 de los productos resultantes del tratamiento con NBS de la histona H1 de insecto.

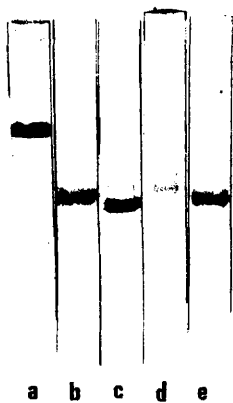


Figura 23. Electroforesis de los picos resultantes de la cromatografía. (a) histona H1 de insecto intacta, (b) productos resultantes del tratamiento con NBS de H1 de insecto, (c) tratamiento con NBS de la H1 de timo de ternera, (d) pico NBS-1, (e) pico NBS-2.

tan totalmente de acuerdo con los de estos autores.

La histona de insecto posee dos residuos de tirosina, por lo que sería de esperar que un tratamiento similar produzca un conjunto de péptidos mucho más complejo, resultado de las diferentes reactividades de las dos tirosinas. La cromatografía en Sephadex G-100 de la mezcla de reacción muestra la aparición de tres picos (figura 22), cuyas imágenes electroforéticas se muestran en la figura 23.

Los picos NBS-1 y NBS-2 tienen una movilidad electroforética y composición de aminoácidos muy parecidas entre sí (figura 23d y 23e, Tabla V) y relativamente similares al péptido N1 obtenido por tratamiento con NBS de la histona H1 de timo de conejo, y que corresponde a la región 72-Cterminal de la molécula (Bustin y Cole, 1969), indicando que estos picos podrían corresponder a regiones muy similares en la histona de insecto.

Por otro lado, estos picos se pueden separar en cromatografía (aunque no claramente, sino que NBS-1 aparece como un hombro), implicando que corresponden a diferentes péptidos. Además el contenido en peso del pico NBS-2 es muy superior al del pico NBS-1 en la mezcla de reacción. Estos hechos sugieren una proximidad en la secuencia de los dos restos de tirosina, así como una mayor reactividad con el agente de uno de estos dos residuos.



Figura 24. Electroforesis de los productos resultantes del tratamiento con NBS de H1 de insecto intacta y modificada. (a) H1 intacta, (b) H1 nitrada en una tirosina, (c) Tratamiento con NBS de H1 intacta, (d) Tratamiento con NBS de H1 modificada en una tirosina.

TABLA V: Composición de aminoácidos de los péptidos resultantes del tratamiento con NBS de la histona H1 de *Ceratitidis capitata*.

Aminoácido	N1 <sup>a</sup> (72-216)	N2 <sup>a</sup> (1-72)	NBS-1	NBS-2	NBS-3
ASX	4.0	1.1	4.0	3.0	7.6
THR	6.2	1.9	7.6	7.9	6.7
SER	7.3	4.1	12.3	12.7	11.5
GLX	3.7	3.9	5.4	5.1	5.4
PRO	16.7	6.2	4.9	4.3	7.7
GLY	9.2	5.4	10.6	11.3	6.6
ALA	37.2	19.2	17.7	17.9	18.2
CYS	0.0	0.0	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
VAL	6.6	2.3	5.1	4.3	10.1
MET	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
ILE	0.9	0.9	2.1	1.3	5.0
LEU	5.1	4.0	3.6	3.2	4.6
TYR	-	-	-	-	-
PHE	0.8	0.0	0.5	0.3	0.0
LYS	52.6	12.2	25.8	27.0	14.3
HIS	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0
ARG	1.1	1.7	0.7	0.0	1.8
<b>BASICOS</b>	6.7	2.8	2.8	3.3	1.3
<b>ACIDOS</b>					

<sup>a</sup> Composición de los péptidos N1 (72-216) y N2 (1-72) de la histona H1 (RTL3) de timo de conejo (Bustin y Cole, 1969).

<sup>b</sup> ND no determinado

Cuando el tratamiento se llevó a cabo con H1 de insecto modificada por nitración específica en una tirosina, en la electroforesis se observó la presencia de tres bandas prácticamente igual de intensas, correspondiendo la de menor movilidad a la histona H1 intacta y las otras dos restantes a las ya comentadas de los picos NBS-1 y NBS-2 de la cromatografía. Estos resultados indican que la nitración destruye la especificidad de la NBS por uno de los dos restos de tirosina, presumiblemente por ser este residuo, de alta reactividad con NBS, el que sufre la modificación específica. Estos resultados pueden correlacionarse con los cambios en estructura secundaria de la proteína nitrada, como se discutirá posteriormente.

El tamaño de los péptidos de rotura con NBS que se aprecian en la electroforésis (NBS-1, NBS-2) es menor que el del péptido obtenido por tratamiento con CNBr ( $PG_{CNB}$ ). Si suponemos que los picos NBS-1 y NBS-2 corresponden a fragmentos que contienen la región C-terminal de la histona, como parece indicar la composición de aminoácidos similar al péptido N1 de timo de conejo, la ausencia de metionina e histidina en ambos y el alto contenido en lisina, entonces los dos residuos de tirosina se encuentran hacia la región 50-90 de la molécula.

#### 3.1.5. DEGRADACION DE H1 DE CERATITIS CAPITATA CON QUIMOTRIPSINA

En la degradación con quimotripsina de H1 de insecto no se observó la presencia de péptidos-límites característicos, contrariamente a lo que ocurre en H1 de timo de ternera. En los geles de electroforesis se observó la presencia de múltiples bandas, que en el curso de la reacción hidrolítica iban continuamente desapareciendo.

#### 3.1.6. DEGRADACION DE $PG_{CNB}$ CON TRIPSINA

Cuando se realizó la digestión controlada con tripsina (en relación 1/1000) del  $PG_{CNB}$ , en idénticas condiciones que

que con la H1 intacta, tal y como se indicó en el apartado 2.5.1., no se observó la existencia de péptidos resistentes a la digestión. En la electroforesis, la banda correspondiente al PG<sub>CNB</sub> desaparecía rápidamente, de forma que a los 10 minutos de incubación el gel no se conseguía teñir, indicando la ausencia de material proteico. Este resultado demuestra que la pérdida del fragmento N-terminal-metionina es suficiente para que la estructura terciaria que puede adoptar el PG<sub>CNB</sub>, en las condiciones en que se llevó a cabo el tratamiento, deje más accesibles los residuos de lisina y arginina de la región globular de la histona a la acción proteolítica.

### 3.1.7. DEGRADACION COMPARATIVA DE H1 DE TIMO DE TERNERA Y CERATITIS CAPITATA CON TROMBINA

La digestión controlada de la histona H1 de timo de ternera con trombina rompe la molécula preferentemente por la secuencia -Pro-Lys-Lys-Ala-, correspondiente a la región 119-122 (Chapman et al., 1976). La cromatografía en carboximetilcelulosa de los productos resultantes a 4 horas de digestión con la enzima es capaz de separar los fragmentos 1-122 y 122-Cterminal de H1 de timo de ternera (Chapman et al., 1976). El estudio comparativo de la digestión de H1 de insecto puede revelar importantes datos sobre una posible similitud en estructura primaria de las dos histonas.

El transcurso de la digestión con trombina de la histona H1 de *Ceratitidis* en las mismas condiciones que la de timo, seguida por electroforesis, se muestra en la figura 25. Desde los primeros minutos de digestión se observa la aparición de bandas de alta movilidad, productos de la degradación enzimática de la histona, y otras de baja movilidad, correspondientes a agregados de diferentes tamaños moleculares, formados por los péptidos de degradación que contienen cisteína.

Dos de las bandas de alta movilidad, denominadas A y B en la figura 25, que comienzan a aparecer al principio de la reacción, aumentan de intensidad durante el transcurso de la misma, pa

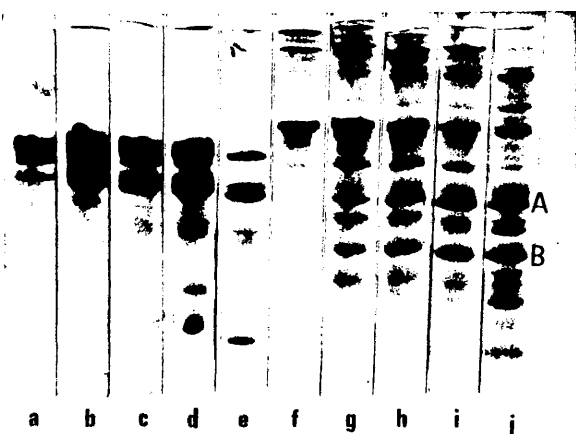


Figura 25. Electroforesis comparativa de las digestiones con trombina de las histonas H1 de timo de ternera (a-e) y Ceratitis capitata (f-j). Las alícuotas se tomaron de la mezcla de reacción a (a y f) 1, (b y g) 20, (c y h) 60, (d e i) 120, y (e y j) 240 minutos.

ra ser las bandas mayoritarias al final de las 4 horas de digestión.

Las cromatografías en carboximetilcelulosa de los productos de digestión a 4 horas de la histona H1 de timo de ternera e insecto se muestran en las figuras 26 y 27 respectivamente. Las movilidades electroforéticas de los picos resultantes en ambas se muestran en la figura 28.

Los resultados obtenidos con H1 de timo son coincidentes con los de Chapman et al. (1976). En H1 de insecto se observa la presencia de cuatro picos en la cromatografía. La movilidad electroforética del pico TC-3 es idéntica a la de la banda A, resultante de la digestión enzimática. Asimismo, en este pico (figura 28i) se observa ya la aparición de otra banda minoritaria cuya movilidad coincide con la banda B, y que llega a ser la mayoritaria en el pico TC-4.



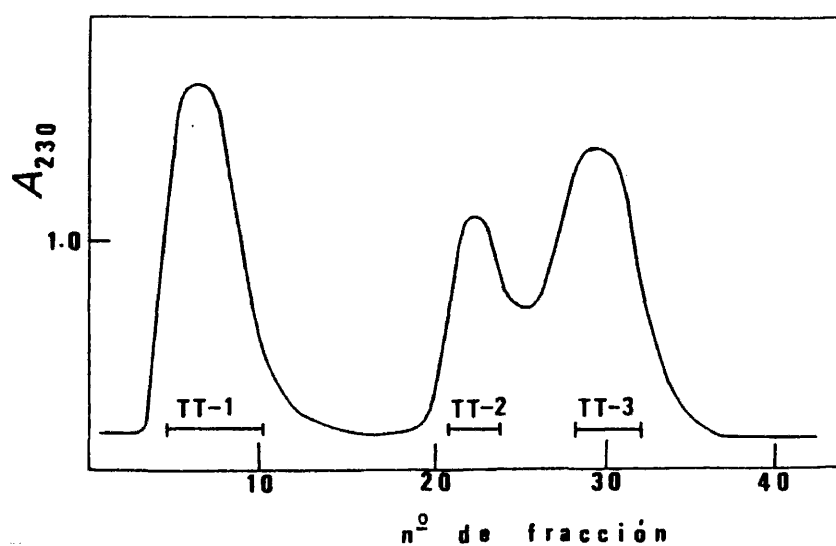


Figura 26. Perfil de elución de la cromatografía en carboximetil-celulosa de los productos de digestión con trombina de H1 de timo de ternera.

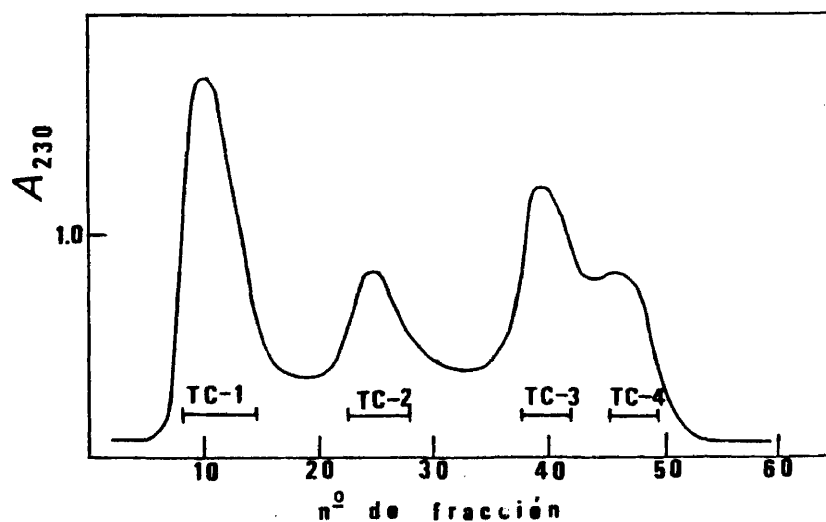


Figura 27. Perfil de elución de la cromatografía en carboximetil-celulosa de los productos de digestión con trombina de H1 de insecto.

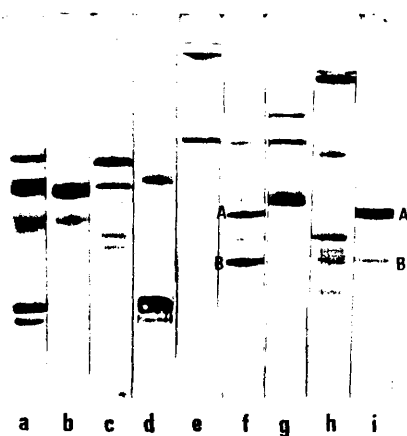


Figura 28. Electroforesis de los picos resultantes en las cromatografías en carboximetilcelulosa de las digestiones con trombina de H1 de timo e insecto. (a) Productos de digestión de H1 de timo, (b) Pico TT-1, (c) Pico TT-2, (d) Pico TT-3, (e) H1 de insecto, (f) Productos de digestión de H1 de *Ceratitidis*, (g) Pico TC-1, (h) Pico TC-2, (i) Pico TC-3.

Los análisis de aminoácidos de los picos de la cromatografía de la digestión con trombina de H1 de *Ceratitidis*, comparados con los obtenidos en la de H1 de timo, se indican en la tabla VI. Chapman et al. (1976) demostraron que el pico que primero eluye de la carboximetilcelulosa corresponde a la región 1-120, y el último pico (TT-3) a la región restante de la molécula. La composición de aminoácidos del pico TC-3 de H1 de insecto es muy similar al de la región 120-Cterminal de H1 de timo, siendo ambos análisis típicos de la región C-terminal, muy básica, de las histonas H1. Sin embargo, la diferencia en movilidad electroforética de ambos es bastante significativa. Probablemente se trate de regiones homólogas en ambas histonas, si bien el pico TC-3 de insecto, debido a su menor porcentaje en residuos básicos (hecho que se pone de manifiesto en las moléculas intactas) y su mayor peso molecular, migre de forma diferente en electroforesis.

TABLA VI: Composición de aminoácidos de los picos de las cromatografías en carboximetilcelulosa de las digestiones con trombina de H1 de timo de ternera y *Ceratitidis capitata*.

Aminoácido	TT-1	TT-2	TT-3	TC-1	TC-2	TC-3
ASX	4.1	2.8	1.1	6.6	4.8	3.3
THR	6.1	6.3	5.9	5.9	7.3	7.9
SER	8.7	6.8	4.6	10.1	10.9	12.7
GLX	7.3	4.4	1.6	7.0	6.2	5.3
PRO	5.5	8.6	9.5	5.9	4.6	3.5
GLY	9.4	7.7	5.9	5.3	7.8	9.0
ALA	20.3	22.9	29.4	15.6	15.8	18.0
CYS	0.0	0.0	0.0	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
VAL	5.9	5.3	3.5	7.8	5.8	4.2
MET	0.0	0.0	0.0	1.2	0.4	0.0
ILE	2.0	1.6	0.9	5.4	2.7	1.0
LEU	8.2	4.4	1.3	5.5	4.1	2.9
TYR	0.9	0.9	0.0	2.2	1.8	0.8
PHE	0.9	0.7	0.0	1.2	0.9	0.5
LYS	17.2	24.3	35.8	15.4	22.6	32.5
HIS	0.0	0.0	0.0	2.4	1.0	0.2
ARG	3.3	2.5	1.1	2.4	3.2	1.1
<u>BASICOS</u>	1.8	3.8	14.8	1.5	2.4	3.9
ACIDOS						

<sup>a</sup> ND no determinado

El pico TC-4 de insecto, lógicamente más básico por su elución en la cromatografía, posiblemente tenga una mayor contribución de la zona C-terminal de la molécula.

Por otra parte, también se realizó la digestión con trombina de la histona de insecto a diferentes tiempos (4 y 14 horas). La diferencia más importante observada entre estas dos digestiones es la desaparición progresiva de la banda A a la vez que la mezcla se va enriqueciendo en un péptido de mayor movilidad electroforética (banda C), que ya era visible, aunque minoritario, en la digestión a 4 horas (figura 29).

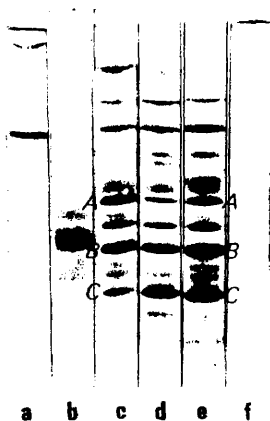
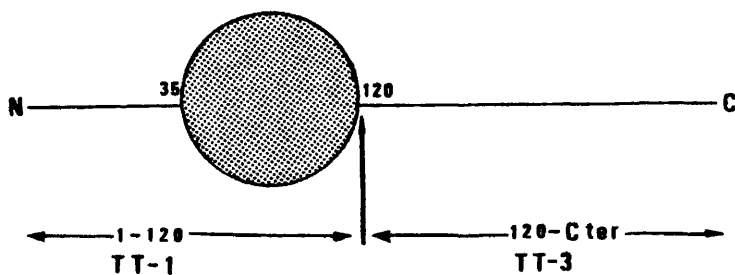


Figura 29. Electroforesis de las digestiones a 4 y 14 horas con trombina de H1 de *Ceratitidis capitata*. (a) H1 intacta, (b) PRT de insecto, (c) productos después de 4 horas de digestión, (d) y (e) Productos después de 14 horas de digestión, (f) control de la trombina empleada en la incubación.

La región 1-120 de la histona de timo, que eluye como el primer pico, tiene una composición de aminoácidos y movilidad electroforética muy similares al pico TC-1 de la digestión de H1 de insecto (figura 28, tabla VI).

Basándose en estos datos de composición de aminoácidos, movilidad electroforética y elución en la cromatografía, se puede proponer un modelo comparativo de los diferentes puntos aproximados de ruptura por la trombina en la H1 de *Ceratitidis capitata*, correlacionándolos con las diferentes bandas que aparecen en los geles de la electroforesis.

H1 T.t.



H1 C.c.

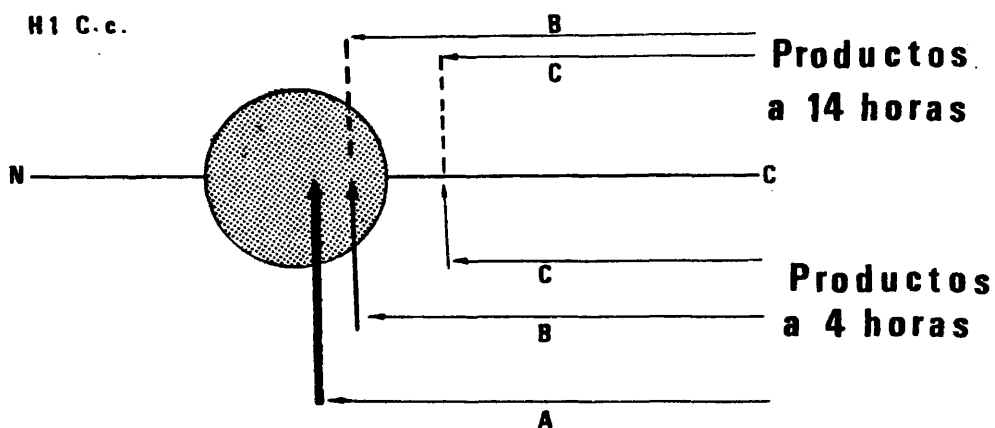


Figura 30. Modelo propuesto para los puntos de digestión preferente con trombina en H1 de insecto. (————) Indica los puntos de ruptura de mayor susceptibilidad. (———) Indica los puntos de susceptibilidad intermedia. (——) Indica los puntos de menor susceptibilidad a la ruptura por el enzima. En H1 de timo, la molécula se escinde en dos fragmentos mayoritarios, 1-120 y 120-Cter minal, (Chapman et al., 1976).

De este modo, el péptido correspondiente a la banda A se iría degradando a dos péptidos de menor tamaño (bandas B y C) a tiempos largos de incubación (14 horas). La región N-terminal de la histona probablemente sea más fácilmente degradable y no aparezca por tanto como banda mayoritaria en la electroforésis de la digestión a tiempos cortos (4 horas).

#### 3.1.8. DETERMINACION DEL RESIDUO N-TERMINAL

Los residuos N-terminales de algunos péptidos aislados y purificados correspondientes a las hidrólisis químicas y enzimáticas llevadas a cabo con la histona se realizaron según el método descrito en el apartado 2.3.4.

La histona H1 intacta de *Ceratitidis capitata* probablemente tenga bloqueado su residuo N-terminal, como muestran los intentos sin resultado positivo realizados sobre este punto. Se determinaron los residuos N-terminales de algunos péptidos correspondientes a diferentes regiones de la histona de insecto, según se muestra en la tabla VII.

TABLA VII: Residuos N-terminales de péptidos obtenidos por hidrólisis química con CNBr y NBS y por digestión controlada con tripsina de la histona H1 de *Ceratitidis capitata*.

Péptido	Aminoácido N-terminal
PRT	Lisina
PG <sub>CNB</sub>	Valina
PG <sub>CNB</sub> -PRT	Valina
NBS-2	Leucina
NBS-1	Lisina

### 3.1.9. MAPAS TRIPTICOS

El objeto de estos estudios es la comparación de estructuras primarias entre las histonas de timo e insecto y las de sus correspondientes PRTs entre sí.

En la figura 31a se recogen los mapas tripticos de las histonas H1 de *Ceratitidis* y timo de ternera. Según se observa en la misma, el número de péptidos tripticos de ambas histonas es muy elevado, debido al alto porcentaje en residuos básicos que contiene, y sobre todo se aprecia un gran número de péptidos de alta migración en la electroforesis, casi indistinguibles. Estos resultados hacen muy difícil tratar de esclarecer algún tipo de homología entre los péptidos de ambas moléculas. Sin embargo, los PRTs, más hidrofóbicos y menos básicos, serán mucho más idóneos para este fin. Por otra parte tiene mayor interés el estudio sobre éstos, ya que esta región parece ser la más conservada de la molécula de histona. En la figura 18b se muestran los mapas tripticos de los PRTs de ambas histonas obtenidos en idénticas condiciones. Los péptidos tripticos resultantes de varios mapas del PRT de insecto se extrajeron y se determinó su composición y número aproximado de aminoácidos (tabla VIII).

Según se observa en la figura 31b, la analogía existente entre ambos mapas, de timo y *Ceratitidis* es muy baja, hecho que viene a reafirmar los resultados de análisis de aminoácidos para los péptidos tripticos del PRT de insecto cuando se comparan con los péptidos tripticos idealizados que se obtendrían de la región 35-120 de H1 de timo de ternera (tabla IX). Sin embargo, sí existen algunas similitudes importantes de resaltar. El péptido triptico que contiene la tirosina 72 de timo es bastante análogo, en tamaño y composición de aminoácidos, al péptido que contiene una de las tirosinas en insecto (péptidos\* de la tabla IX). Estos resultados por sí solos, no son suficientes para afirmar la existencia de grandes diferencias en la estructura primaria de ambos PRTs, y hace falta esperar resultados de secuencia para poder emitir un juicio más justificado. Por otra parte el péptido 13 de *Ceratitidis* no dió resultados positivos en el análisis de aminoácidos, probablemente de

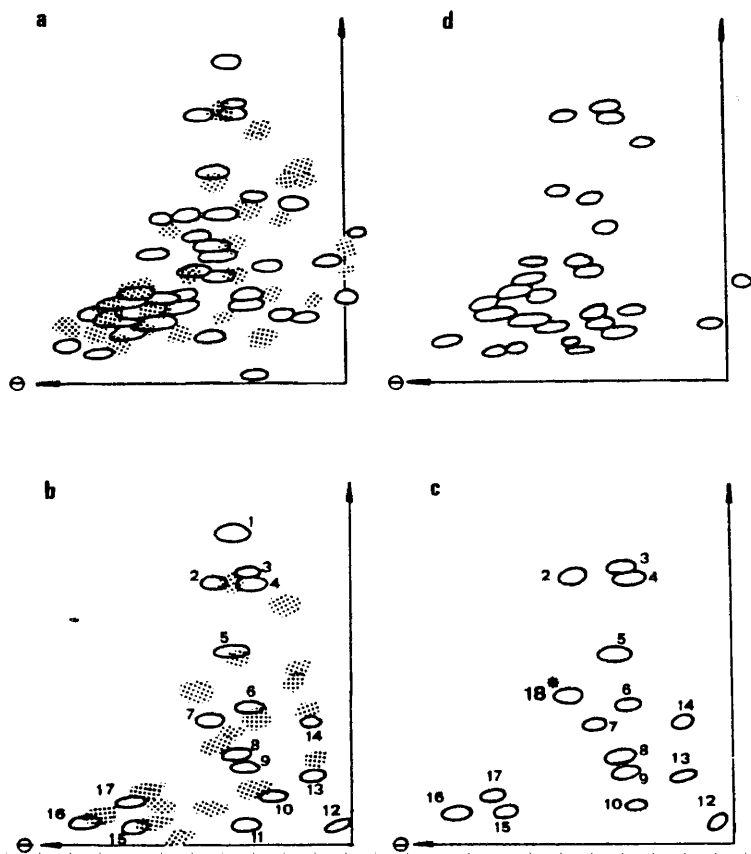


Figura 31. (a) Mapas trípticos de las histonas H1 de timo de ternera  $\square$  y *Ceratitidis capitata*  $\circ$ . (b) Mapas trípticos de los PRTs de timo de ternera  $\square$  y *Ceratitidis capitata*  $\circ$ . (c) Mapa tríptico del PG<sub>CNB</sub>-PRT. (d) Mapa tríptico del PG<sub>CNB</sub>.



TABLA VIII: Número de residuos aproximado de los péptidos trípticos del PRT de *Ceratitidis* calculados suponiendo un residuo de Lys o Arg en cada uno de ellos.

Aminoácido	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9	T-10	T-11	T-12	T-14	T-15	T-16	T-17
ASX						1				1	1	1				
THR			1		1	1		1		1			1			
SER	1		2	2	1	1		2		1	0-1	1				
GLX	0-1		1	1	1	1				1	1	1-2	1			
PRO	2									1						
GLY	1		1	2		1		1-2	1					1		
ALA	1		2	2		2		1	1	2	2	2	2			
CYS			1 <sup>a</sup>													
VAL								1-2		0-1						
MET										1						
ILE	1		1	1	1					1						
LEU	1	1	1	1	1	1	1									
TYR		1	1													
PHE													1			
LYS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
HIS	1															
ARG										1						1

<sup>a</sup> Determinado como ácido cisteico

TABLA IX: Número de residuos de los péptidos trípticos de los PRTs de timo de ternera y *Ceratitis capitata*.

<sup>a</sup> PRT Timo de ternera	<sup>b</sup> PRT <i>Ceratitis capitata</i>
1) 1Lys	16) 1Lys
2) 1Ile, 1Lys	17) 1Arg
3) 1Pro, 1Lys	15) 1Gly, 1Lys
4) 1Glu, 1Arg	10) 1Glx, 1Arg
5) 1Leu, 1Asn, 1Lys	7) 1Asx, 1Leu, 1Lys
6) 2Asn, 1Ser, 1Arg	2) 1Leu, 1Tyr, 1Lys
7) 1Gly, 2Leu, 1Lys	8) 1-2Gly, 1Ala, 1Lys
8) 2Ser, 1Val, 1Leu, 1Lys	12) 1Asx, 0-1Ser, 1-2Glx, 2Ala, 1Lys
9) 1Ser, 3Ala, 1Val, 1Lys	5) 1Thr, 1Ser, 1Glx, 1Ile, 1Leu, 1Lys
10) 2Thr, 1Gly, 1Glu, 1Val, 1Leu, 1Lys	14) 1Asx, 1Thr, 1Ser, 1Glx, 2Ala, 1Lys
11) 1Thr, 1Ser, 2Gly, 1Ala, 1Phe, 1Lys	9) 1Thr, 2Ser, 1Gly, 1Ala, 1-2Val, 1Lys
12) 1Ser, 1Glu, 1Gly, 3Ala, 1Lys	1) 1Ser, 0-1Glx, 2Pro, 1Gly, 1Ala, 1Ile, 1Leu, 1Lys
13) 2Ser, 1Gly, 2Ala, 2Leu, 1Val, 1Lys	6) 1Thr, 1Ser, 1Glx, 1Gly, 2Ala, 1Leu, 1Lys
14)*1Glu, 1Asp, 1Gly, 4Ala, 1Leu, 1Tyr, 1Val, 1Lys	4) 2Ser, 1Glx, 2Gly, 2Ala, 1Ile, 1Leu, 1Lys
15) 1Thr, 2Ser, 1Glu, 2Pro, 1Gly, 1Ala, 1Val, 1Ile, 1Leu, 1Lys	3)*1Thr, 2Ser, 1Glx, 1Gly, 2Ala, 1Cys, 1Ile, 1Leu, 1Tyr, 1Lys
	11) 1Asx, 1Thr, 1Ser, 1Glx, 1Pro, 2Ala, 0-1Val, 1Met, 1Ile, 1Lys

<sup>a</sup> Péptidos trípticos a partir de la secuencia del dominio central de H1 de timo de ternera.

<sup>b</sup> Deducidos a partir de la composición de aminoácidos (Tabla VIII)

bido a que no se extrajo bien de la placa en las condiciones empleadas.

Con el fin de tratar de determinar qué péptido tríptico contiene el residuo de metionina se efectuaron mapas trípticos de los péptidos de mayor tamaño molecular, resultantes de las hidrólisis con CNBr de H1 intacta y PRT, con objeto de compararlos con los obtenidos en las moléculas de donde proceden. La figura 31d muestra el mapa tríptico obtenido del  $PG_{C_{NB}}$ ; el correspondiente a la H1 no se superpone por no complicar la figura. En este caso, la ausencia en este péptido de la región N-terminal de la molécula hace difícil obtener comparaciones no erróneas. La figura 31c muestra el mapa tríptico del  $PG_{C_{NB}}-PRT$ . En este caso, la presencia de un menor número de péptidos, hace más fácil este estudio comparativo. Los péptidos que se han denominado 1 y 11 del mapa tríptico del PRT están ausentes en el mapa del  $PG_{C_{NB}}-PRT$ , y aparece en este último caso un péptido nuevo que se ha llamado 18\*. El péptido 1 también está ausente en el mapa del  $PG_{C_{NB}}$  (figura 31d).

El péptido 11, que contiene metionina (ver tabla VIII), como consecuencia de la ruptura con CNBr da origen a otros dos nuevos péptidos, de los cuales el C-terminal es lógicamente el péptido 18\*, que aparece en el mapa del  $PG_{C_{NB}}-PRT$ , mientras que el N-terminal no está presente, lógicamente, en dicho mapa. El péptido 1, por tanto, debe corresponder a la región N-terminal del PRT, desde el primer residuo del péptido resistente hasta la primera lisina que se encuentra en la estructura primaria.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede hacer una evaluación aproximada de los residuos de que consta la región N-terminal del PRT, tal y como se muestra en la tabla X. Estos datos serán posteriormente comparados con los obtenidos por secuencia de esta misma región.

#### 3.1.10. SECUENCIA PARCIAL DEL PEPTIDO RESISTENTE A LA TRIPSINA DE CERATITIS CAPITATA

La secuencia de un fragmento N-terminal del PRT de in-

TABLA X: Número de residuos aproximado para la región N-terminal-metionina del PRT de *Ceratitis capitata*.

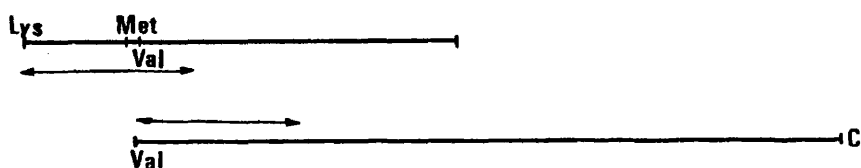
Aminoácido	PP <sub>CNB</sub> -PRT (pico ST-3) <sup>a</sup>	N-Met (M. Trípticos) <sup>b</sup>
ASX	1	0-1
THR	2	1
SER	1-2	1-2
GLX	2	1-2
PRO	3	2-3
GLY	1	1
ALA	3	1-3
CYS	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
VAL	0	0-1
MET	1	1
ILE	1	1-2
LEU	0	1
TYR	0	0
PHE	0	0
LYS	1-2	1
HIS	1	1
ARG	0	0

<sup>a</sup> Residuos calculados suponiendo 1 residuo de histidina en dicho péptido.

<sup>b</sup> Residuos calculados de los péptidos 1 y 11 del mapa tríptico del PRT.

<sup>c</sup> ND no determinado.

secto se realizó por solapamiento de dos fragmentos, secuenciados, uno a partir del PRT y el segundo a partir del PG<sub>CNB</sub>. Se utilizaron estos dos péptidos, ya que la proximidad del residuo de metionina al extremo N-terminal del PRT ofrecía una gran posibilidad de solapar las secuencias parciales obtenidas de ambos.



La secuencia de este fragmento N-terminal se muestra en la figura 32.

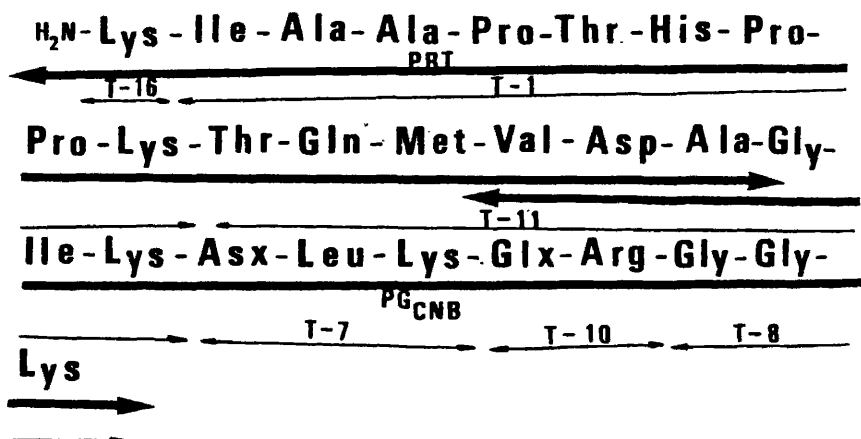


Figura 32. Secuencia parcial del PRT de *Ceratitis capitata* obtenida por solapamiento de las secuencias parciales de PRT y PG<sub>CNB</sub>.

A la vista de esta secuencia se pueden adjudicar las posiciones correspondientes a algunos de los péptidos trípticos obtenidos, como se muestra en la figura 32, basándose principalmente en el número de residuos calculado para éstos. Además, se confirman en gran parte las predicciones realizadas en el apartado anterior, sobre el contenido de residuos de la región N-terminal del PRT (ver tablas X y XI).

TABLA XI: Comparación de los resultados de secuencia y los análisis de aminoácidos de los péptidos I y II.

Aminoácido	Péptido T-I	Péptido T-II	(T-I+T-II)	Secuencia Lys1-Lys19
ASX	-	1	1	1
THR	-	1	1	2
SER	1	1	2	-
GLX	0-1	1	1-2	1
PRO	2	1	3	3
GLY	1	-	1	1
ALA	1	2	3	3
CYS	-	-	-	-
VAL	-	0-1	0-1	1
MET	-	1	1	1
ILE	1	1	2	2
LEU	1	-	1	-
TYR	-	-	-	-
PHE	-	-	-	-
LYS	1	1	2	3
HIS	1	-	1	1
ARG	-	-	-	-

La diferencia en el número de lisinas se debe lógicamente a la existencia de este residuo como aminoácido N-terminal del PRT de insecto.

Cuando esta secuencia de 27 aminoácidos se compara con la de regiones análogas de otras histonas muy ricas en lisina, cuya estructura primaria se conoce, (figura 33), se observan algunas características de particular interés. En primer término, el grado mayor de homología con este dominio de H1 de insecto se encuentra con idénticas regiones de las histonas H1 de embrión de erizo de mar (48% de residuos conservados), y de esperma de erizo de mar (44% de conservatividad), después y en orden decreciente, con H5 de eritrocito de pollo (33%), H1 de mamíferos (26%) y por último con H1 de testículo de trucha (18%), como se muestra en la figura 34.

Esta mayor semejanza estructural entre las histonas de insecto y erizo debe traducirse en una mayor similitud funcional. Además, como se pone de manifiesto en la figura 34, estas secuencias de los dominios centrales de H1 de erizo y *Ceratitidis capitata* se pueden alinear, encontrando un mayor número de restos conservados con H5 de eritrocito de pollo que con las histonas H1 de mamíferos y testículo de trucha. Este resultado podría indicar una situación evolutiva intermedia, de estas histonas de invertebrados, entre las histonas H1 de mamíferos y la otra clase de histona muy rica en lisina, presente en eritrocitos de ave (H5). En este mismo sentido se han descrito resultados de secuencia parcial de la subfracción H1° bovina (Smith et al., 1980).

Por otra parte, se observa la existencia de residuos muy altamente conservados, como son Pro 8, Lys 22, Arg 24 y Gly 26 en todas las moléculas de histonas H1/5 comparadas (figura 33). Probablemente esta alta conservatividad venga condicionada por una importante misión estructural de estos residuos. La región global de las histonas H1/5 posee, sin duda, en todas ellas, una relación estructural profunda, que le capacita para una cierta protección al ataque de la tripsina y una gran similitud en estructura terciaria. Sería muy tentador pensar que esta relación estructural está gobernada por residuos muy conservados en el proceso evolutivo, como los que se han mencionado. Sin embargo los rasgos estructurales más minuciosos, propios de cada una de ellas, podrían venir regulados por residuos tales como los que se conservan en las

**A** DOMINIO CENTRAL

K	A	S	G	P	P	V	S	E	L	I	T	K	A	V	A	S	K	E	R	S	G	V				
K	A	A	G	P	P	V	S	E	L	I	T	K	A	V	A	S	K	E	R	N	G	L				
K	P	G	S	G	P	A	V	G	E	L	A	G	K	A	V	A	S	K	E	R	S	G	V			
R	S	A	S	H	P	T	Y	S	E	M	I	A	A	I	R	A	E	K	S	R	G	G	S			
R	A	R	A	S	T	H	P	P	V	L	E	M	V	Q	A	A	I	T	A	M	K	E	R	K	G	S
K		P	A	A	H	P	P	A	A	E	M	V	T	T	A	I	K	E	L	K	E	R	K	G	S	
K	I	A	A	P	T	H	P	P	K	T	Q	M	V	D	A	G	I	K	B	L	K	Z	R	G	G	K
												M	I	V	A	A	I	N	A	E	K	N	R	A	G	K

H1	T. Ternera	{	CTL-1	}
H1	T. Conejo	{	RTL-3	}
H1	Test. Trucha			
H5	Eritrocito Pollo			
H1	Esp. Erizo	{	P.A.]	}
H1	Emb.	{	P.M.]	}
H1	Insecto	{	C.c.]	}
H1°	Bovina			

H1 T. Ternera (CTL-1)  
H1 T. Conejo (RTL-3)  
H1 Test. Trucha  
H5 Eritrocito Pollo  
H1 Esp. Erizo (P.A.)  
H1 Emb. " (P.M.)  
H1 Insecto (C.c.)  
H1° Bovina

Figura 33. Secuencia N-terminal de los 27 primeros residuos del PRT de *Cenatitidis capitata* comparada con la de regiones homólogas de otras histonas muy ricas en lisina.  
  Residuos conservados en todas ellas.   Residuos conservados, incluyendo los cambios conservativos.   Péptidos idénticos en insecto y erizo de mar.



<b>B</b>		
<b>DC C.c.-T.ørnera</b>	Lys 1, Ala 3, Pro 8, Pro 9, Lys 22, Arg 24, Gly 26	26%
<b>DC C.c.-T.c.</b>	Lys 1, Ala 3, Pro 8, Pro 9, Lys 22, Arg 24, Gly 26	26%
<b>DC C.c.-T.trucha</b>	Lys 1, Pro 8, Lys 22, Arg 24, Gly 26	18%
<b>DC C.c.-E.p.</b>	Ala 3, His 7, Pro 8, Met 13, Ala 16, Ile 18, Lys 22, Gly 25, Gly 26	33%
<b>DC C.c.-P.a.</b>	Ala 4, Thr 6, His 7, Pro 8, Pro 9, Met 13, Val 14, Ala 16, Ile 18, Lys 22, Arg 24, Gly 26	44%
<b>DC C.c.-P.m.</b>	Lys 1, Pro 5, His 7, Pro 8, Pro 9, Met 13, Val 14, Ile 18, Lys 19, Leu 21, Lys 22, Arg 24, Gly 26	48%

Figura 34. Número de residuos que se pueden alinear entre los dominios centrales de H1 de *Cenatitla* y los de las otras histonas H1/5. El grado de conservatividad entre secuencia de insecto y de lae demás se expresa en %.

moléculas de H1 de mamíferos (Gly<sup>4</sup>Pro<sup>5</sup>Pro<sup>6</sup>, Glu<sup>9</sup>Leu<sup>10</sup>Ile<sup>11</sup>, entre H1 de timo de ternera y timo de conejo) o entre H1 de insecto y de erizo (His<sup>7</sup>Pro<sup>8</sup>Pro<sup>9</sup>, Glu<sup>12</sup>Met<sup>13</sup>Val<sup>14</sup>), indicando así una proximidad funcional mayor entre estas dos histonas (insecto y erizo) en su papel en la cromatina.

### 3.2. MODIFICACION COVALENTE. NITRACION

La reacción de nitración de residuos de tirosina en moléculas de proteínas, aunque a menudo difícil de interpretar sin ambigüedades debido a la posibilidad de reacciones secundarias, ofrece importante información y ha sido utilizada en el estudio estructural y funcional de residuos de tirosina en un gran número de proteínas (ribonucleasa, Beaven y Gratzer, 1968; H1 de timo, Bustin, 1971; Bradbury et al., 1976; aldolasa, Christen y Riordan, 1968; etc.).

La presencia de dos residuos de tirosina, con características diferentes, en H1 de *Ceratitidis*, ofrece la posibilidad de estudiar las transiciones conformacionales de las correspondientes moléculas nitradas (H1 de timo e insecto), a la vez que puede informar de la localización de los residuos de tirosina, ya que la reactividad de estos residuos frente al agente de nitración es dependiente de su accesibilidad (Bustin, 1971; Beaven y Gratzer, 1968).

El grado y velocidad de nitración de las histonas de timo e insecto dependen de las condiciones en las que se lleve a cabo la nitración. Cuando las moléculas se encuentran en tampón GuCl 6 M-Tris 0.3 M a pH 8.0, la nitración transcurre a mayor velocidad; así mismo se obtiene un mayor porcentaje de tirosina nitrada que en el caso de que las histonas se encuentren plegadas en NaCl 1.0 M-Fosfato 50 mM a pH 8.0 (ver figura 35). Si bien en la histona de timo es el aumento de nitración, en condiciones desnaturalizantes, es apenas un 15%, resultado que está de acuerdo con los obtenidos por Bustin (1971), en la histona de insecto se observa una mayor diferencia entre ambos medios.

Por otra parte, en el caso de H1 de *Ceratitidis* las curvas

van siempre por encima de las obtenidas en las cinéticas de timo, resultado lógico, teniendo en cuenta la existencia de dos residuos de tirosina en H1 de insecto, mientras que en H1 de timo solo hay una tirosina.

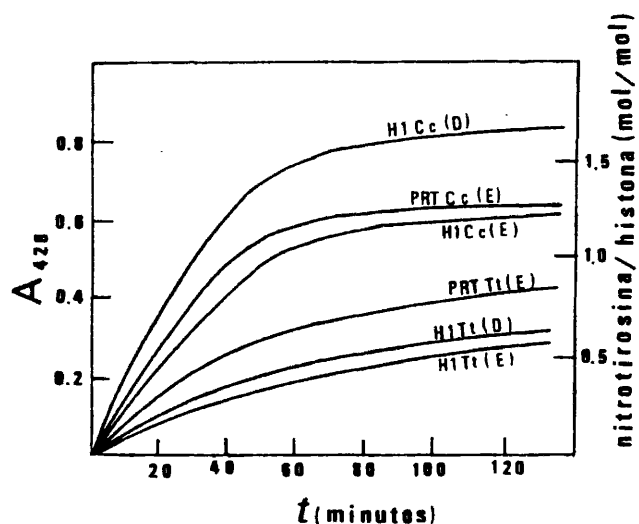


Figura 35. Cinéticas de nitración de H1 de timo de ternera, H1 de *Ceratitidis capitata* y sus correspondientes PRTs. (D) y (E) indican los diferentes medios, desnaturalizante y estructurante respectivamente, utilizados para la reacción. El grado de nitración se expresa como número de tirosinas nitradas en cada uno de los casos.

En los PRTs los resultados fueron muy similares, y no se han expresado las cuatro curvas correspondientes a ellos por no complicar la figura. Sin embargo, sí posee importancia el hecho de que los PRTs se nitren a mayor velocidad que sus respectivas moléculas paternas, en idénticas condiciones (este resultado se discutirá más adelante, a la vista de experimentos posteriores).

La nitración se detuvo a los 100 minutos ó 48 horas según los casos, y se evaluaron los porcentajes de nitrotirosina en cada una de las muestras. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XII.

Tabla XII: Número de tirosinas nitradas en Hl de timo de ternera, Hl de insecto y sus correspondientes PRTs, según el medio y las condiciones de la reacción.

Muestra	Condiciones	Tiempo	N° de nitrotirosinas	
Hl timo de ternera	NaCl 1.0 M-Fosfato 5) mM pH 8 (E)	100 min	(a) 0.5	(b) 0.6
	GuCl 6 M-Tris 0.3 M pH 8 (D)	100 min	0.6	0.8
	(E)	100 min	0.8	ND <sup>c</sup>
Hl Ceratitis capitata	(D)	100 min	0.9	ND <sup>c</sup>
	(E)	100 min	1.2	1.1
	(E)	48 hr	1.7	1.7
HRT Ceratitis capitata	(D)	100 min	1.5	ND <sup>c</sup>
	(E)	100 min	1.3	ND <sup>c</sup>
	(E)	48 hr	1.9	ND <sup>c</sup>

a) Evaluados espectrofotometricamente.

b) Determinados por la desaparición del pico de tirosina en el análisis de aminoácidos.

ND No determinado.

La determinación del porcentaje de nitración por el análisis de aminoácidos de cada muestra se realizó suponiendo la existencia de dos residuos de fenilalanina para la histona de insecto y su PRT, y de un solo resto de fenilalanina para la histona y PRT de timo de ternera.

### 3.3. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA EN LAS HISTONAS H1 DE CERATITIS CAPITATA, TIMO DE TERNERA Y SUS RESPECTIVAS REGIONES GLOBULARES.

Resulta de gran interés, como se comentó en la introducción, el estudio de la estructura secundaria en estas proteínas, y lo que es más importante, las posibles transiciones conformacionales como consecuencia de cambios en el entorno (fuerza iónica, pH, utilización de disolventes no acuosos, influencia de detergentes, etc.). Bradbury et al. (1975a, 1975b) y Smerdon e Isenberg (1976), han realizado algunos de estos estudios, seguidos por diferentes técnicas (fundamentalmente dicroísmo circular), con H1 de timo de ternera. En el presente trabajo se extiende este estudio a H1 de *Ceratitis capitata* y las correspondientes regiones resistentes a la tripsina. Estos estudios se realizaron principalmente también por dicroísmo circular, técnica que nos da un valor estadístico en % de las distintas contribuciones conformacionales ( $\alpha$ -hélice, estructura  $\beta$  y cadena estadística), pero que tiene la ventaja sobre otras (difracción de rayos X, espectroscopía en el infrarrojo, etc.) de que se puede utilizar con la muestra en disolución y por tanto, los resultados obtenidos pueden extrapolarse más fácilmente a situaciones "in vivo".

#### 3.3.1. EFECTO DEL pH Y LA FUERZA IONICA.

Las histonas H1 de timo y *Ceratitis* no muestran cambios apreciables en su espectro de dicroísmo circular en la región del UV lejano, es decir no exhiben cambios en su estructura secundaria,

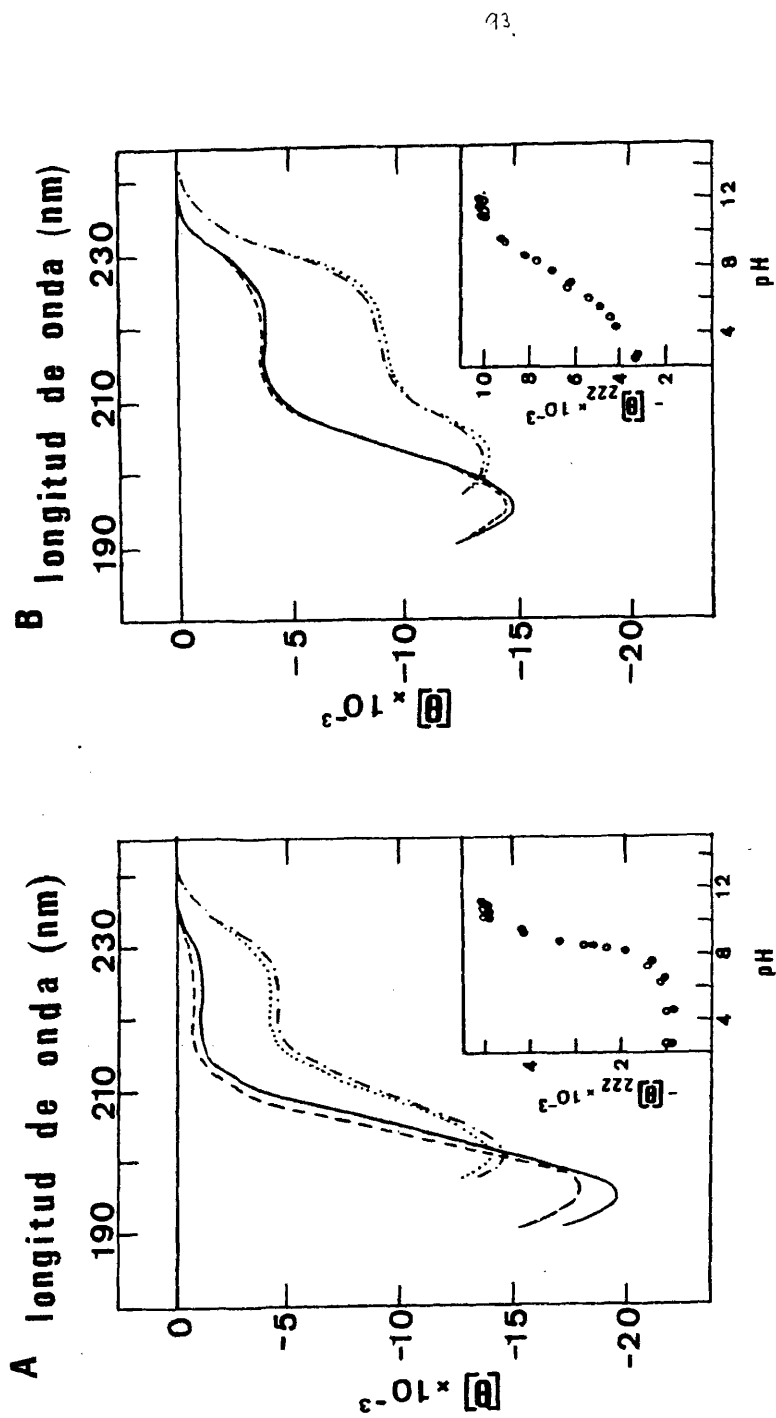


Figura 36. Espectro de dicroísmo circular (UV lejano) de las histonas H1 (A) y sus correspondientes PRTs (B) a diferentes valores de pH. (—) H1 y PRT de *Cenatitls* a pH 2.8; (---) H1 y PRT de timo a pH 2.8; (---) H1 y PRT de *Cenatitls* a pH 10.6; (.....) H1 y PRT de timo a pH 10.6. En el recuadro se muestra la variación de  $[\theta]_{222}$  con el pH; (●) H1 y PRT de timo; (○) H1 y PRT de insecto.

entre pH 2.8 y 6.5 (figura 36). Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano observados para ambas, en estas condiciones, son si milares y típicos de estructura en cadena estadística. Por el contrario, en el margen de pH entre 7.0 y 10.0, tiene lugar un proceso de transición conformacional en ambas histonas, adquiriendo un mayor porcentaje de  $\alpha$ -hélice, y resultando ser el punto medio de la transición a pH 8.3 como se observa en la figura 36. Obviamente, la titulación de los residuos de lisina de la molécula puede dar cuenta de esta transición conformacional cooperativa. En este aspecto, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Smerdon e Isenberg (1976), aunque no con los de Bradbury (1975a).

Ambas histonas, de timo y de insecto, llegan a su máximo grado de estructuración a pH 10.0. Las contribuciones de  $\alpha$ -hélice, estructura  $\beta$  y cadena estadística se muestran en la tabla XIII.

TABLA XIII: Estructura secundaria de las histonas H1 y sus correspondientes PRTs.

Histona	Condiciones de plegamiento		% de		
	pH	KF (M)	$\alpha$ -hélice <sup>a</sup>	estructura $\beta$ <sup>a</sup>	C.E. <sup>a</sup>
H1 timo de	10.2	0.0	8	3	89
ternera	6.0	0.3	8	3	89
H1 <i>Ceratitidis</i>	10.2	0.0	8	1	91
<i>capitata</i>	6.0	0.3	9	4	87
PRT timo de	10.2	0.0	22	0	78
ternera					
PRT <i>Ceratitidis</i>	10.2	0.0	22	0	78
<i>capitata</i>					

<sup>a</sup> Porcentajes obtenidos de los coeficientes en las ecuaciones teóricas que mejor se ajustaron a las curvas experimentales.

Estos datos se obtuvieron, como se reseña en la tabla, ajustando las curvas experimentales por el método de Chen et al. (1972), pero modificado según Montero y Morán (comunicación personal). Se obtuvieron muy buenos ajustes, como se muestra en la figura 37.

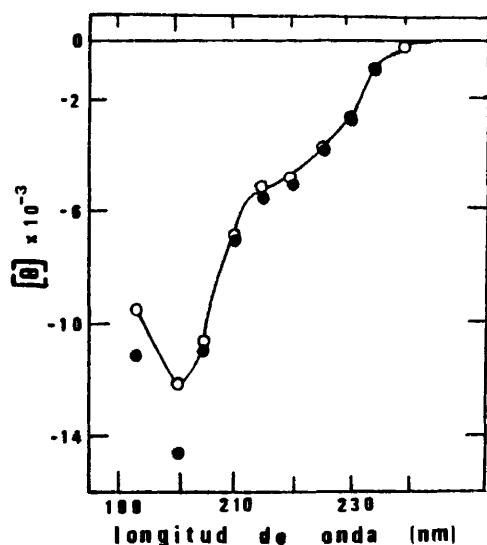


Figura 37. Espectro de dicroísmo circular del PRT de timo a pH ácido. (○) Puntos experimentales; (●) puntos teóricos, correspondientes al ajuste óptimo.

Por otro lado, los cambios conformacionales inducidos por la variación de fuerza iónica no muestran el mismo comportamiento, ya que al representar  $[\theta]_{222}$  frente a la concentración de KF resulta una curva hiperbólica (figura 38). Ambas histonas se encuentran totalmente estructuradas a una concentración de aproximadamente 0.3 M en KF a pH 6.0, y las contribuciones de las diferentes estructuras secundarias para este tipo de plegamiento se muestran en la tabla XIII.

El conjunto de estos hechos pone de manifiesto una gran similitud en las transiciones estructurales y el grado final de estructuración en ambas histonas.

Los cambios conformacionales de los PRTs poseen algunas diferencias con respecto a los de las moléculas intactas. En primer lugar, el espectro de dicroísmo circular de ambos péptidos re-



sistentes de timo e insecto a pH 2.8 (figura 36) muestra que a estos valores de pH ácido, existe ya algún tipo de estructura ordenada en la molécula (aproximadamente 5% de  $\alpha$ -hélice). En segundo lugar, las transiciones estructurales tienen lugar entre pH 2.8 y 12.0 y son menos cooperativas que en las moléculas intactas, como se observa en la figura 36. Este hecho puede ser explicado, ya que los PRTs poseen un menor porcentaje de residuos cargados positivamente. Lógicamente la presencia de las regiones N-terminal y C-terminal en las moléculas intactas es la causa de la mayor cooperatividad, ya que la región 35-120 de la molécula de timo contiene 17 aminoácidos básicos y 6 residuos ácidos, mientras que el contenido de la molécula intacta es de 66 básicos y la de residuos ácidos mucho menor. Esto supone que a pH neutro, el PRT tendría una carga neta de +11, mientras que la carga de la molécula intacta sería aproximadamente +57 a ese mismo pH. Así se explicaría que los PRTs puedan comenzar a estructurarse a valores de pH bajos, mientras que la estructura de las moléculas intactas necesita valores superiores para minimizar las repulsiones electrostáticas. Los resultados de estructura primaria, ya comentados, indican que en insecto la histona H1 tiene una distribución muy similar de los residuos ácidos y básicos, por lo que los resultados se explican de igual manera. Sin embargo, una vez comenzada la estructuración, se completa rápidamente, de aquí la alta cooperatividad.

Los PRTs poseen un gran porcentaje de contribución de  $\alpha$ -hélice a la estructura secundaria global de la molécula (22% en timo e insecto, tabla XIII), como consecuencia del aumento del pH. Este comportamiento de los PRTs de las histonas claramente apoya la idea de que contienen la región globular de las moléculas intactas. Por otra parte, este resultado se esperaba, ya que la digestión trípica se realizó en NaCl 1.0 M, y la proteína está ya estructurada en su máximo grado en 0.3 M de KF. Sin embargo, existe una prueba más directa, todos los segmentos de  $\alpha$ -hélice de las moléculas paternas se encuentran en los PRTs. Este dato se puede hallar sin más que realizar un simple cálculo, teniendo en cuenta los tamaños moleculares aproximados de las histonas y los PRTs correspondientes.

Las transiciones estructurales inducidas por el incremen

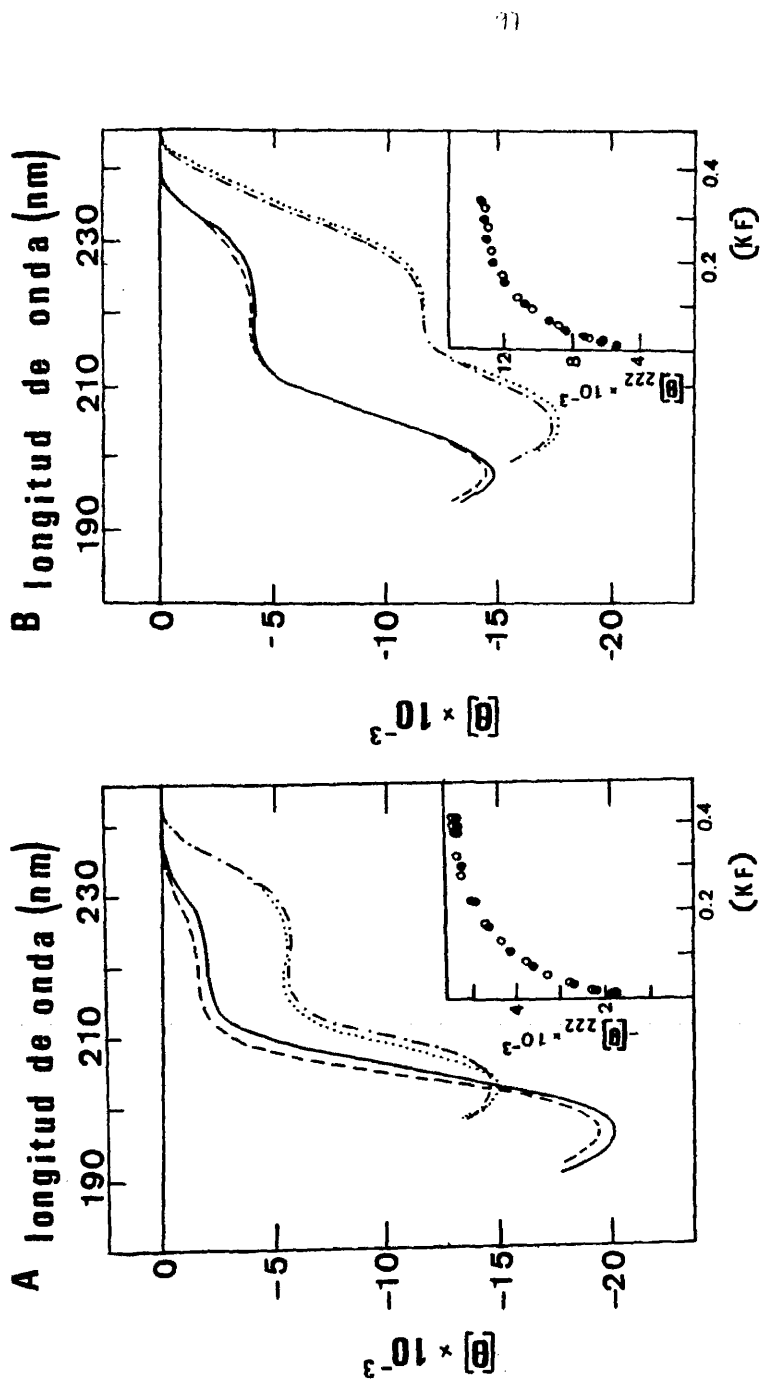


Figura 38. Espectros de dicroísmo circular (UV lejano) de las histonas H1 (A) y sus correspondientes PRTs (B) a diferentes valores de fuerza iónica. (—) H1 y PRT de *Cetaxia litidis* en agua, pH 2.8; (---) H1 y PRT de tимо en agua, pH 2.8; (-·-·-) H1 y PRT de *Cetaxitia* en KF 0.35 M, pH 6.0; (.....) H1 y PRT de tимо en KF 0.35 M, pH 6.0. En el recuadro se muestra la variación de  $[\theta]_{222}$  con la concentración de KF; (○) H1 y PRT de tимо; (●) H1 y PRT de insecto.

to de fuerza iónica en los PRTs no son sigmoideas (figura 38), al igual que ocurría en las moléculas intactas. Este resultado puede ser indicativo de una falta de cooperatividad en los cambios conformacionales inducidos por sal. Mientras que el aumento de pH lleva consigo una estructuración fundamentalmente debido a la titulación de los residuos básicos, la adición de sal, además de apantallar cargas, principalmente favorece las interacciones hidrofóbicas en la molécula. Las diferentes influencias de estas dos condiciones (pH y fuerza iónica) pueden dar origen a las diferencias observadas en las transiciones conformacionales inducidas para ambas (cooperativas y no cooperativas respectivamente).

En cuanto a la existencia de estructura  $\beta$  en las moléculas de histonas, el mejor ajuste de las curvas experimentales a las curvas teóricas se consiguió cuando se introdujo un pequeño porcentaje de dicha estructura para las histonas plegadas por aumento de sal o del pH (tabla XIII). Sin embargo, el rango de error estimado para el cálculo de esta estructura es suficientemente alto como para no tomar este dato como realmente significativo.

### 3.3.2. EFECTO DEL SDS.

Los detergentes han sido agentes muy utilizados en el estudio conformacional de un gran número de proteínas, debido fundamentalmente a su papel como agentes desnaturalizantes, con características muy peculiares y que pueden servir de ayuda en la interpretación de resultados obtenidos con otro tipo de agentes.

En el caso de las histonas H1 el SDS ha sido empleado, por ejemplo, en el estudio de la nitración de H1 de timo de ternera (Bustin, 1971). Por ello se pensó que la investigación de las transiciones conformacionales, así como el grado máximo de estructuración conseguidos con el SDS, podría revelar valiosos datos sobre el comportamiento estructural de las dos histonas.

La figura 39 muestra los espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano de las histonas H1 de timo de ternera e



insecto en los estados inicial y final del tratamiento con el detergente en agua a pH ácido. Los cambios conformacionales que experimentan ambas histonas como consecuencia de la adición de SDS, revelan un ostensible aumento de  $\alpha$ -hélice en perjuicio de la estructura en cadena estadística, sin que apenas existan variaciones en el pequeño porcentaje de estructura  $\beta$  (figura 40).

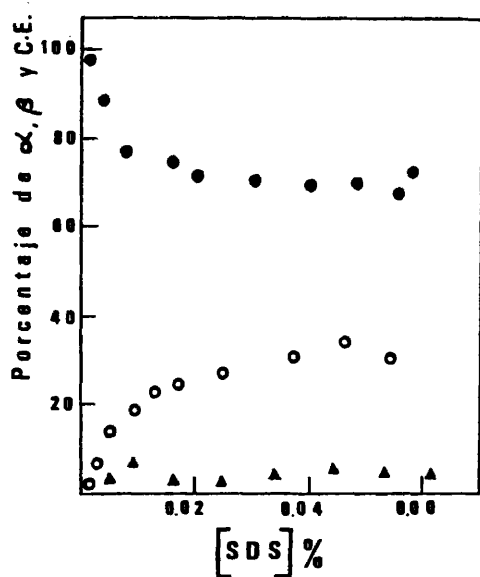


Figura 40. Variación en el porcentaje de los diferentes tipos de estructura secundaria, en H1 de timo, con el aumento en la concentración de SDS. (○)  $\alpha$ -hélice; (▲) estructura  $\beta$ ; (●) cadena estadística.

Las contribuciones a la estructura secundaria, según las diferentes condiciones empleadas, se muestran en la tabla XIV.

La  $[\theta]_{222}$  aumenta de una forma hiperbólica, al igual que ocurría al variar la fuerza iónica. El porcentaje de  $\alpha$ -hélice, a concentraciones elevadas del agente ( $\geq 0.04\%$ , p/v), llega a ser del 30% en ambas histonas, muy superior al que se conseguía mediante la adición de sal.

En otro sentido, cuando el SDS se añadió a disoluciones de histonas en NaCl 0.35 M, donde las proteínas se encuentran ya estructuradas, los resultados revelaron algunas diferencias, respecto

a las disoluciones acuosas, interesantes de discutir. Los espectros finales conseguidos por la adición de SDS, en estas condiciones, son idénticos a los obtenidos al partir de moléculas en disolución acuosa a pH ácido (figura 39). Sin embargo, la transición hacia esta estructura final idéntica es mucho más gradual, según se observa en las medidas de  $[\theta]_{222}$  con el aumento en la concentración de SDS en ambas condiciones (agua a pH ácido y NaCl 0.35 M (figura 39). Es decir, mientras que la meseta se conseguía a 0.04 % (p/v) en SDS en el caso de la histona disuelta en agua, en cambio se necesitan concentraciones más elevadas del agente (aproximadamente 0.05%, p/v) para llegar a la estructura final cuando la histona se encontraba previamente plegada por sal.

TABLA XIV: Estructura secundaria de las histonas H1 de timo e insecto inducida por SDS.

Histona	Condiciones			% de		
	Histona disuelta en	Posterior adición de SDS.		$\alpha$ -hélice <sup>a</sup>	estructura $\beta$ <sup>a</sup>	C.T.E. <sup>a</sup>
H1 timo ternera	Agua a pH					
	ácido.	0.05% (p/v)	29	4	64	
	NaCl 0.35 M	0.05% "	31	7	62	
H1 Cera- titis	Agua a pH					
	ácido.	0.05% "	29	3	68	
	NaCl 0.35 M	0.05% "	33	9	58	

<sup>a</sup> Estos porcentajes se obtuvieron ajustando las curvas experimentales por el método de Chen et al., (1972), modificado por Morán y Montero (comunicación personal).

El SDS contrarresta las cargas positivas de los residuos básicos de la histona, por lo que la estructura final de estas proteínas en presencia del detergente puede adquirir un elevado porcentaje de  $\alpha$ -hélice a costa de zonas distintas de la molécula, que cuando la estructuración se lleva a cabo por la fuerza iónica. De esta forma es fácilmente explicable la diferencia observada en la estructuración, cuando la histona se encuentra disuelta en sal. En este caso el SDS debe contrarrestar el efecto de la fuerza iónica y desplazar la estructura originaria de las histonas en este medio hacia una estructura diferente, con una contribución mayor de  $\alpha$ -hélice, como ya se ha comentado.

Estos resultados reafirman una influencia idéntica del SDS sobre las histonas de timo y *Ceratitidis*, al menos en estructura secundaria, y un similar comportamiento de ambas moléculas en este medio (igual concentración de SDS para alcanzar la estructura final).

Los tratamientos idénticos, llevados a cabo con los PRTs, muestran resultados en todo similares, consiguiéndose un 23-25% de  $\alpha$ -hélice a concentraciones de 0.04-0.05% en SDS.

### 3.3.3. EFECTO DE LA NITRACION

El estudio estructural por dicroísmo circular en la región del UV lejano de las histonas H1 de timo e insecto y sus correspondientes PRTs modificadas con tetranitrometano resulta de suma importancia, teniendo en cuenta que las transiciones conformacionales de esta molécula pueden relacionarse con un cambio de entorno de los residuos de tirosina (ver resultados de estructura terciaria), que tienen particular interés en la histona de insecto y que deben venir completados por los estudios en la variación de la estructura secundaria de la molécula como consecuencia de la modificación de sus residuos de tirosina. Con este propósito se estudiaron las transiciones estructurales de las histonas de timo y *Ceratitidis*, que previamente habían sido modificadas por nitración con tetranitrometano, unas veces en condiciones estructurantes (NaCl 1.0 M-Fosfato 50 mM, pH 8.0), y otras en condiciones desnatu

ralizantes (GuCl 6 M-Tris 0.3 M pH 8.0), tal y como se indic6 en el apartado 3.2.

Los espectros de dicroismo circular en el UV lejano de ambas histonas modificadas en presencia y ausencia de sal (KF 0.4 M) se muestran en la figura 41. La estructuraci6n m6xima que se consigue con las histonas modificadas se obtiene a concentraciones de 0.35 M en KF. Las contribuciones a la estructura secundaria de  $\alpha$ -h6lice, estructura  $\beta$  y cadena estadística se indican en la tabla XV, que puede compararse con la XIII (histonas sin nitrar).

TABLA XV: Estructura secundaria inducida por sal de las histonas y sus PRTs modificados.

Histona	N° de tirosinas nitradas	Condiciones de plegamiento		% de		
		pH	KF (M)	$\alpha$	$\beta$	C.E.
H1 timo de	0.7	3.0	0.0	0	0	100
ternera	0.7	6.0	0.4	8	0	92
H1 <i>Ceratitidis</i>	1.2	3.0	0.0	1	0	99
<i>capitata</i>	1.2	6.0	0.4	9	0	91
	1.7	3.0	0.0	1	0	99
	1.7	6.0	0.4	7	0	93
PRT timo de	1.0	3.0	0.0	5	0	95
ternera	1.0	6.0	0.4	18	3	79
PRT <i>Ceratitidis</i>	1.3	3.0	0.0	6	0	94
<i>capitata</i>	1.3	6.0	0.4	9	0	91
	1.9	3.0	0.0	5	0	95
	1.9	6.0	0.4	7	0	93

- Los porcentajes de  $\alpha$ ,  $\beta$  y cadena estadística se ajustaron por el mismo método que en el caso de las transiciones inducidas por el SDS (tabla XIV).



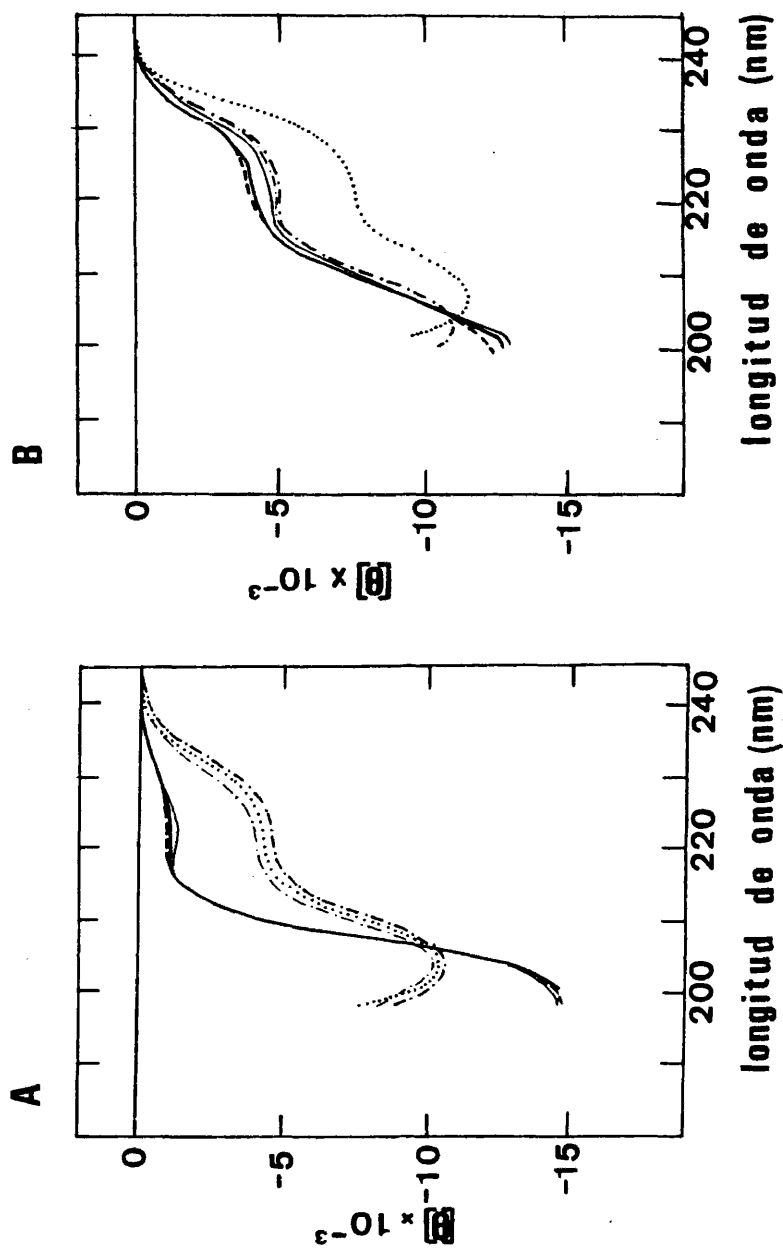


Figura 41. Espectros de dicroísmo circular (UV lejano) de las histonas (A) y sus PRTs modificados (B). (—) H1 y PRT de timo nitrados 100 m; (---) H1 y PRT de insecto nitrados 100 m; (---) H1 y PRT de insecto nitrados 24 h., todos estos en agua a pH ácido. (---) H1 y PRT de timo de ternera nitrados 100 m.; (---) H1 y PRT de insecto nitrado 100 m.; (---) H1 y PRT de insecto nitrados 24 h.; todos estos en KF 0.4 M, pH 6.0. Todas las muestras se nitraron en condiciones estructurantes.

Como se observa en la tabla, la estructura secundaria que adquieren las histonas nitradas por la adición de sal es prácticamente idéntica a la que tienen las moléculas intactas por el mismo hecho, y únicamente se aprecia una pequeña diferencia en el caso de H1 de insecto nitrada en condiciones más drásticas (48 h. de reacción) y en la que el cálculo reveló la presencia de 1.7 residuos de nitrotirosina. En ésta, el porcentaje de  $\alpha$ -hélice final es del 7% frente a un 9% que contiene en KF 0.4 M la H1 nitrada en condiciones más suaves (100 m y 1.2 residuos de nitrotirosina).

En el caso de los PRTs, las diferencias observadas son mucho mayores. Mientras el PRT de timo llega a alcanzar un 18% de  $\alpha$ -hélice en 0.4 M KF pH 6, en el caso del PRT de *Ceratitidis capitata* nitrado, en condiciones tales que se obtiene 1.3 nitrotirosinas exclusivamente, se llega a un 9% de  $\alpha$ -hélice y cuando la nitración del PRT de insecto se lleva a cabo en condiciones más enérgicas (1.9 nitrotirosinas), tan solo se alcanza un 7% de  $\alpha$ -hélice. Sin embargo, todas las moléculas de PRT contienen entre 5-6% de  $\alpha$ -hélice en su estructura a pH ácidos.

La diferencia observada entre el PRT de *Ceratitidis* y la histona H1 de la que procede no puede ser explicada solo por el pequeño aumento observado en el porcentaje de nitración (1.3 y 1.9 residuos de nitrotirosina en el PRT frente a 1.2 y 1.7 respectivamente en H1 de insecto). No obstante, cabe otra posible hipótesis que será discutida posteriormente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la estructura terciaria de las moléculas nitradas. Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de los PRTs se muestra asimismo en la figura 41.

#### 3.3.4. INFLUENCIA EN LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA PERDIDA DE UN FRAGMENTO N-TERMINAL DEL PRT DE CERATITIS CAPITATA

El péptido de mayor tamaño molecular, obtenido por hidrólisis con CNBr del PRT de *Ceratitidis capitata*, contiene prácticamente el total de la molécula de PRT, faltándole solo un fragmento de 13 residuos (ver apartado 3.1.10.). Su comportamiento en fluores-

cencia y en dicroísmo circular en el UV próximo muestran importantes características, que le diferencian claramente del PRT y H1 de insecto, por lo que el estudio de dicroísmo circular en el UV lejano y la evaluación de su estructura secundaria en diferentes condiciones salinas, se hacía imprescindible, en orden a poder interpretar más claramente estos resultados obtenidos.

En el  $PG_{C_{NB}}$ -PRT, al aumentar la fuerza iónica, se incrementa el contenido de  $\alpha$ -hélice de la molécula, alcanzándose la máxima estructuración a una concentración en KF 1.1 M (ver tabla XVI), correspondiendo a un 27% de estructura helicoidal. Obsérvese que, al tener en cuenta los tamaños moleculares del PRT y  $PG_{C_{NB}}$ -PRT, el número de residuos en  $\alpha$ -hélice es idéntico para ambos fragmentos. En efecto, suponiendo que el PRT tiene 100 residuos y el  $PG_{C_{NB}}$ -PRT 87, el 22% y 27% de hélice respectivamente corresponde, en ambos casos, a 22-23 residuos. Pero para conseguir este grado de estructuración en el  $PG_{C_{NB}}$ -PRT es preciso aumentar mucho la fuerza iónica, ya que a KF 0.4 M (condiciones en las cuales se obtenía la máxima estructuración en PRT y H1 intacta) solo se alcanza el 16% de estructura en  $\alpha$ -hélice.

La presencia de ese fragmento N-terminal de 13 residuos, que está ausente en el  $PG_{C_{NB}}$ -PRT, parece tener una influencia clara sobre la estructuración. Su falta parece amortiguar la tendencia de la molécula a estructurarse. En la figura 42 se muestran los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano del  $PG_{C_{NB}}$ -PRT a cuatro fuerzas iónicas diferentes. Aunque no se muestra en dicha figura, la variación de  $[\theta]_{222}$  con la concentración salina es de naturaleza hiperbólica, lo cual hace suponer una transición no cooperativa para este péptido, al igual que ocurría con el PRT y H1 intactos.

Por otra parte, el fragmento que se pierde en la hidrólisis con CNBr contiene dos enlaces que implican residuos de lisina, que sin embargo son resistentes a la acción proteolítica (ver resultados de secuencia). Esta localización, poco accesible, de estos enlaces podría sugerir la idea de una situación interna, dentro de la región globular, de este fragmento, con interacciones importantes con otras regiones de la molécula en el mantenimiento de una determinada estructura terciaria. De este modo se podrían explicar las

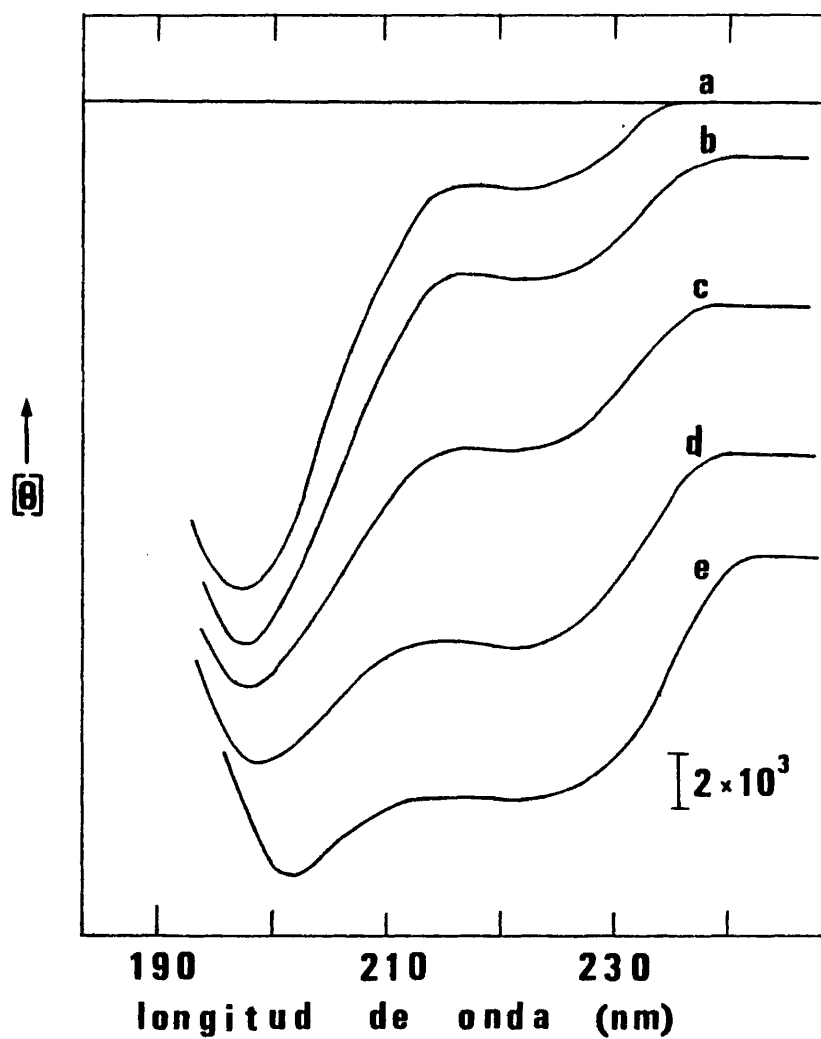


Figura 42. Espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano de soluciones de PG<sub>CNB</sub>-PRT en agua, pH 6.0 (a); KF 0.2 M, pH 6.0 (b); KF 0.4 M, pH 6.0 (c); KF 0.8 M, pH 6.0 (d); KF 1.1 M, pH 6.0 (e).

diferencias ya citadas que tienen lugar en la estructuración del PG<sub>CNB</sub>-PRT.

TABLA XVI: Estructura secundaria del PG<sub>CNB</sub>-PRT en diferentes concentraciones salinas.

Péptido	Condiciones de plegamiento		Z de		
	pH	KF (M)	$\alpha$	$\beta$	C.E.
PG <sub>CNB</sub> -PRT	6.0	0.0	6	0	94
	6.0	0.4	16	0	84
	6.0	0.8	22	0	78
	6.0	1.1	27	0	73

-Los porcentajes de los diferentes tipos de estructura secundaria se determinaron por el método de Chen et al., (1972) modificado por Montero y Morán (comunicación personal).

#### 3.4. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE LAS HISTONAS H1 DE TIMO DE TERNERA Y CERATITIS CAPITATA Y DE SUS RESPECTIVAS REGIONES GLOBULARES RESISTENTES A LA TRIPSINA.

Los estudios de estructura secundaria muestran grandes semejanzas entre las histonas H1 de timo e insecto, así como entre sus péptidos resistentes a la digestión triptica (que contienen las regiones globulares de ambas moléculas). Resulta, por tanto, de extraordinario interés ampliar esta información a niveles superiores de su estructura.

Para ello ha sido necesario realizar estudios en ambas histonas, aplicando diferentes técnicas, fundamentalmente espectroscopía de absorción ultravioleta y de diferencia, fluorescencia y dicroísmo circular en la región del UV próximo. Es importante comentar que los estudios sobre la estructura terciaria de H1 de timo realizados por dicroísmo circular es la primera vez que se llevan a cabo con esta proteína, pues los resultados que sobre su estructura tridimensional se poseen se han realizado principalmente por resonancia magnética nuclear (Bradbury et al., 1975a y 1975b; Chapman et al., 1976 y 1978; Hartman et al., 1977).

Por otra parte, las transiciones conformacionales que tienen lugar en estas dos proteínas, H1 de insecto y de timo, tienen una clara influencia en el entorno que rodea a los residuos aromáticos de las moléculas. La existencia de un único resto de tirosina en H1 de timo y de dos residuos de tirosina en H1 de *Ceratitidis*, así como la ausencia de triptófano en ambas, ofrece grandes ventajas en el estudio e interpretación de los resultados obtenidos por las técnicas ya comentadas. Aprovechando estos hechos, se han conseguido obtener datos valiosos acerca del comportamiento estructural de las proteínas H1 de timo y *Ceratitidis* y sus respectivas regiones globulares, que pueden extrapolarse a su funcionalidad en la cromatina.

#### 3.4.1. INFLUENCIA DEL pH Y LA FUERZA IÓNICA.

Las transiciones conformacionales más importantes, por su significación fisiológica, que son capaces de sufrir estas proteínas son, sin duda, las que tienen lugar con el aumento de la fuerza iónica del medio. Como ya se ha descrito en el apartado anterior, la estructura secundaria que adquieren ambas histonas como consecuencia de un aumento en la concentración de KF es muy similar, resultado que también se obtuvo cuando se comparaban los PRTs de ambas. Por ello se realizó un profundo estudio, comparativo, entre las dos histonas, utilizando las técnicas espectroscópicas anteriormente citadas, que nos dan información fundamentalmente sobre la estructura tridimensional de las moléculas en solución.

#### 3.4.1.1. ESTUDIOS DE ABSORCION ULTRAVIOLETA

Los coeficientes de extinción experimentales a 275 nm, obtenidos para H1 de timo y su PRT en agua, son de 1360 y 1340  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ , respectivamente. La diferencia entre estos dos valores no es en absoluto significativa y está completamente de acuerdo con el valor teórico de 1345  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ , calculado para esta histona (Smerdon e Isenberg, 1976). El valor experimental para la histona de *Ceratitís* y su PRT resultó ser de 2750  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ . Estos resultados están de acuerdo con la presencia de dos residuos de tirosina en la molécula de H1 de insecto, encontrándose ambos en el PRT (tablas III y II, respectivamente). Se puede asimismo descartar la presencia de triptófano en la histona H1 de *Ceratitís* sin más que examinar la curva derivada de su espectro de absorción, la cual no presenta pico ni hombro alguno a 290 nm (figura 43).

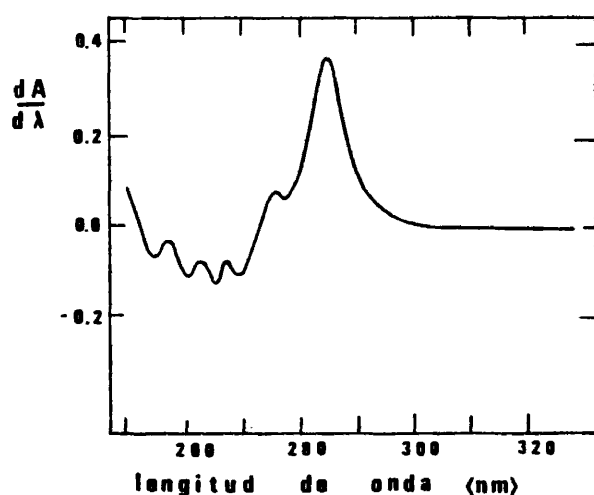


Figura 43. Curva derivada del espectro de absorción de H1 de *Ceratitís*.

Además, la curva obtenida por diferencia entre el espectro de H1 de insecto y de H1 de timo, que se muestra en la figura 44, corresponde al espectro de una tirosina, aunque ligeramente desplazado hacia el rojo, como se observa en la figura 45.

Como ya se ha comentado, ambas histonas están totalmen

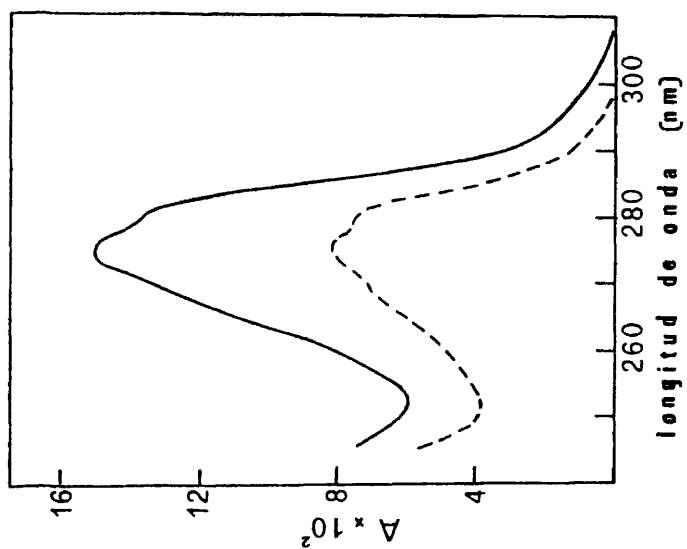


Figura 44. Espectro de absorción ultravioleta de H1 de timo de ternera (---) y de H1 de *Cematitis capitata* (—). En ambos espectros se ha corregido previamente la dispersión.



BIBLIOTECA

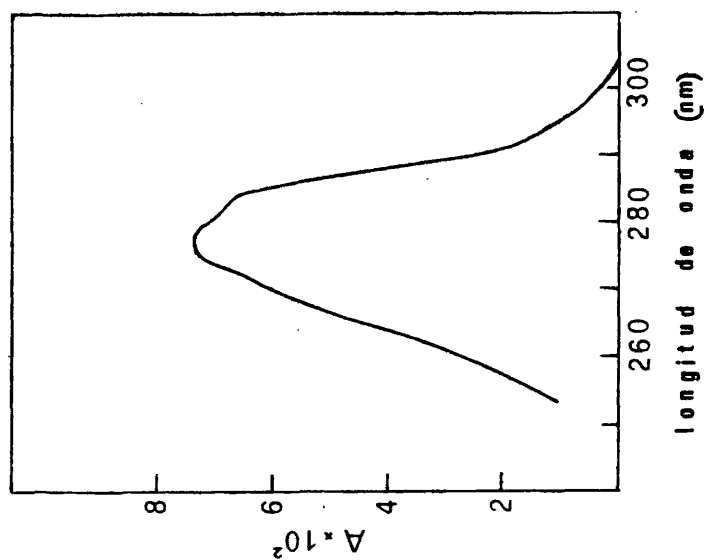


Figura 45. Espectro que resulta cuando se realiza la diferencia entre el espectro de absorción de H1 de insecto y de H1 de timo, representados en la figura 44.



te estructuradas en KF 0.3 M a pH 6.0. Chapman et al. (1978) han demostrado por resonancia magnética nuclear que el único residuo de tirosina de H1 de timo está orientado hacia el interior de la región globular, cuando la proteína está estructurada por sal, y Smerdon e Isenberg, (1976) demostraron que la anisotropía e intensidad de fluorescencia de dicho residuo de tirosina cambian durante la estructuración producida por sal.

Es, por tanto, bastante razonable pensar que la estructuración por aumento de la fuerza iónica tenga una cierta influencia sobre el espectro de absorción. Con motivo de comprobar esta posibilidad se realizaron los espectros de diferencia de las histonas, por un lado, y los PRTs por otro, estructurados por sal y en agua a pH ácido, tal y como se ha descrito en el apartado 2.8.1. La figura 46 muestra el espectro de diferencia de los PRTs. Las curvas obtenidas para las moléculas intactas son prácticamente idénticas.

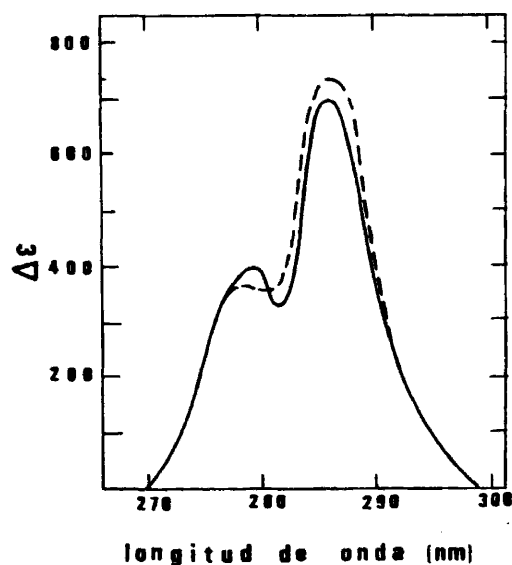


Figura 46. Espectros de diferencia entre los péptidos resistentes a la tripsina, estructurados (0.35 M en KF, pH 6.0) y no estructurados (agua, pH 2.8), de timo (—) y *Ceratitidis* (---).

Como era de esperar, el espectro de diferencia del PRT de timo, y de la misma forma en la H1 correspondiente, corresponde a la transición de un residuo de tirosina de un medio polar a un entorno más apolar. El incremento en el coeficiente de extinción a 285 nm ( $\Delta\epsilon_{285}$ ) resultó ser  $700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , dato que coincide con el estimado para el cambio de absorción molar producido por la transferen-cia de un cromóforo de tipo fenol de un medio acuoso hacia el interior de la proteína (Donovan, 1969).

Aunque hasta ahora no se había descrito ningún espectro de diferencia en este sentido, Smerdon e Isenberg (1976) demostraron que existía una transición hacia el rojo en el espectro de absorción para las cuatro subfracciones mayoritarias de H1 de timo, como consecuencia de la adición de sal al medio.

Sin embargo, el hecho más interesante es que los espectros de diferencia del PRT y de H1 de insecto son muy similares cuantitativamente a los de sus homólogos en timo. Tan sólo se aprecian dos diferencias cualitativas importantes de comentar; el máximo centrado en los 278 nm del espectro de diferencia de timo es menor y aparece como un hombro y no como un pico en el caso del PRT y H1 de insecto; en segundo lugar mientras el otro máximo del espectro de diferencia se encuentra en PRT y H1 de timo en los 285.5 nm, en el caso de *Ceratitidis* está algo desplazado hacia el rojo (286 nm). Teniendo en cuenta que la histona de *Ceratitidis* y su PRT contienen dos residuos de tirosina, estos espectros pueden ser explicados mediante dos hipótesis: a) uno de los residuos de tiro-sina sufre un cambio de entorno como consecuencia de la estructuración por sal, mientras que el segundo residuo no sufre cambio apreciable; b) los dos residuos de tirosina pasan a un entorno algo más apolar durante la estructuración y este resultado de los dos residuos es muy similar al de la única tirosina de H1 de timo. Es-te punto será discutido con posterioridad, a la vista de los resultados de dicroísmo circular y fluorescencia.

Por otra parte, cuando se estudió la variación del  $\Delta A_{285}$  con la fuerza iónica, se observaron diferencias importantes entre el PRT de timo y PRT y H1 de insecto. Según se muestra en la figura 47, el aumento de  $\Delta A_{285}$  en el PRT de timo es hiperbólico, resul

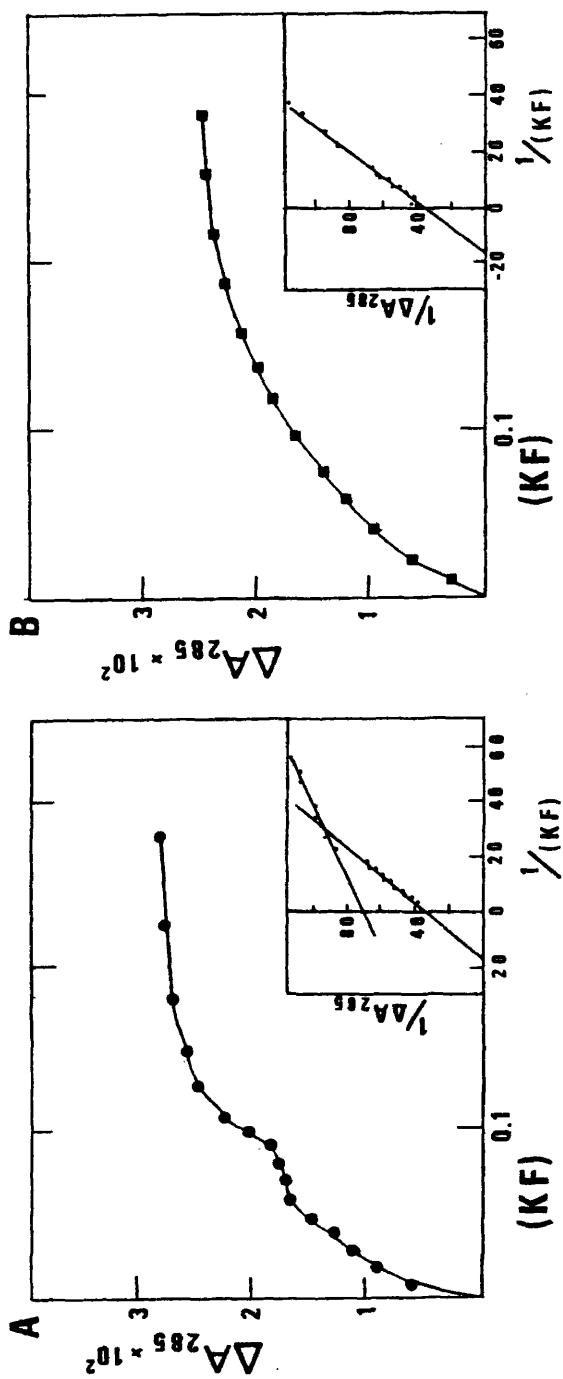


Figura 47. Representación gráfica de la variación del  $\Delta A_{285}$  con el aumento de la concentración de KF para PRT de *Cematitis capitata* (A) y PRT de timo de ternera (B). En el recuadro se muestra la representación de dobles inversos,  $1/\Delta A_{285}$  frente a  $1/(KF)$  para ambos.

tado que se correlaciona con los obtenidos por dicroísmo circular en el UV lejano, ya comentados en el apartado anterior, y que sugiere, aunque no es una afirmación contundente, una falta de cooperatividad en la estructuración de la molécula inducida por sal. La representación de dobles inversos se ajusta a una recta, como se observa en la figura 47, demostrando que el  $\Delta\epsilon_{285}$  para el PRT de timo es aproximadamente  $700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . En el caso del PRT de *Ce-ratitis capitata*, los puntos de la representación no se ajustan a una curva hiperbólica y se observa la presencia de un salto o discontinuidad en la curva, entre 0.07 y 0.1 M en KF. La representación de  $1/\Delta A_{285}$  frente a  $1/(KF)$  no se ajusta a una sola recta, como ocurría en timo, sino que es necesario suponer la presencia de dos rectas distintas, como se observa en la figura 47. La pendiente y el punto de corte con el eje de ordenadas de una de ellas son prácticamente idénticos a los obtenidos en la recta de timo, mientras que la segunda recta difiere bastante en estos resultados.

Este hecho podría significar una estructuración diferente e independiente de los dos residuos de tirosina existentes en la histona H1 y el PRT de insecto; un primer residuo comienza a estructurarse al principio de la adición de sal, mientras que el segundo residuo de tirosina no empieza a tener influencia en el espectro de diferencia hasta una concentración aproximada de 0.09 M en KF. Sin embargo, ambas contribuciones resultan en suma muy similares cuantitativamente a la obtenida con el único residuo de tirosina de H1 y PRT de timo.

#### 3.4.1.2. ESTUDIOS DE DICROISMO CIRCULAR EN LA REGION DEL UV PROXIMO

Es de esperar, a la vista de los resultados de espectroscopía de diferencia, que el dicroísmo circular en la región del

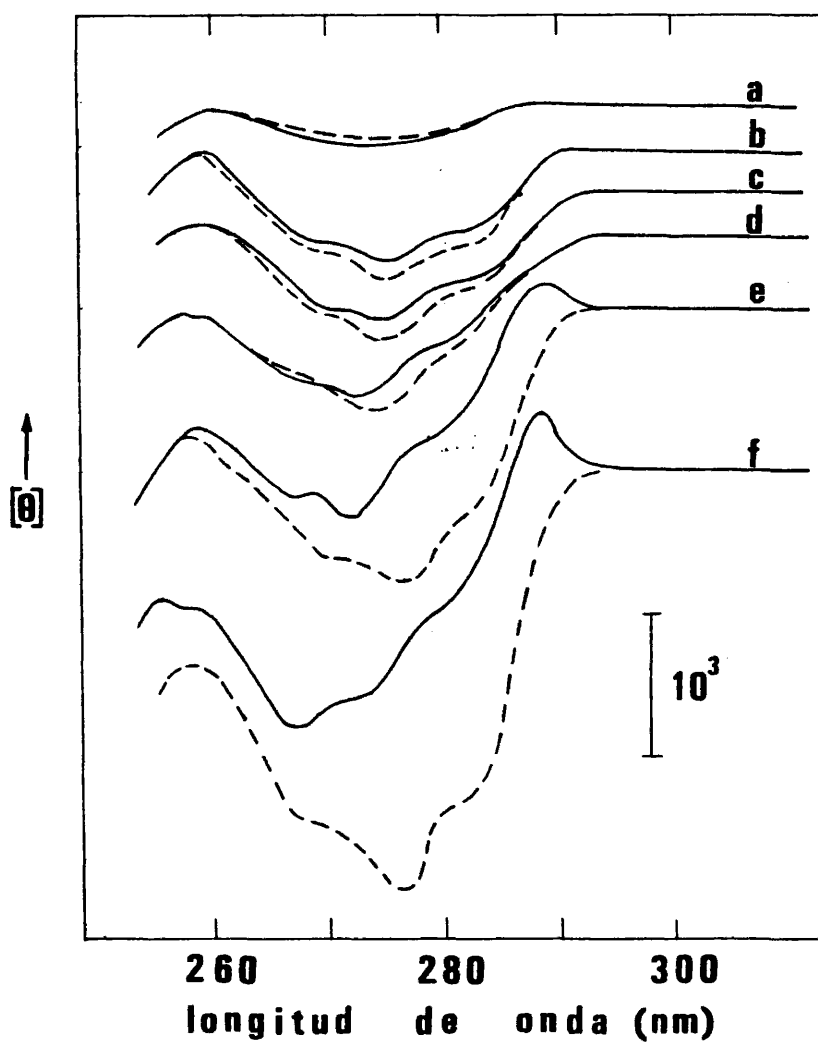


Figura 48. Influencia de la fuerza iónica en el espectro de di-croismo circular de H1 de timo (---) y H1 de *Ceratitidis* (—) en la región del UV próximo. Los espectros se registraron con las histonas H1 disueltas en (a) agua, pH 2.8; (b) KF 0.04 M, pH 6.0; (c) KF 0.06 M, pH 6.0; (d) KF 0.08 M, pH 6.0; (e) KF 0.15 M, pH 6.0; (f) KF 0.25 M, pH 6.0.

UV próximo, nos dé información sobre la estructura terciaria de am bas histonas, ya que los cambios observados en el entorno de las tirosinas puede tener reflejo en el dicroísmo circular de estas dos proteínas en la región de los aromáticos.

En efecto, las figuras 48 y 49 muestran los espectros de dicroísmo circular en el UV próximo de las histonas H1 de timo y *Ceratitisa* diferentes valores de fuerza iónica. Aunque en la figura 48 no se muestran los espectros correspondientes a los PRTs, estos son muy similares a los de las moléculas intactas. La fuerza rotacional de los residuos de tirosina es mucho menor en las moléculas no estructuradas (figura 48a), como es de esperar para cromóforos aislados orientados estadísticamente, sin actividad óptica intrínseca. La estructuración de las proteínas en KF 0.3 M, pH 6.0, induce la aparición de fuerza rotacional, sin embargo, las curvas de dicroísmo circular de H1 de timo y su PRT difieren de las de sus homólogos de *Ceratitisa* no solo cuantitativa sino también cualitativamente (figura 49).

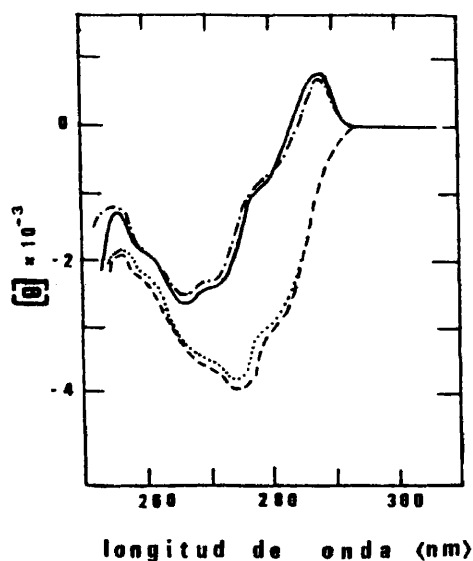


Figura 49. Espectros de dicroísmo circular en el UV próximo de H1 de *Ceratitisa capitata* (—); H1 de timo de ternera (---); PRT de *Ceratitisa capitata* (- - -); PRT de timo de ternera (.....) en KF 0.3 M, pH 6.0.

Es particularmente interesante observar que, mientras el único residuo de tirosina de H1 de timo, cuando la molécula se encuentra en KF 0.3 M, pH 6.0, da una banda de dicroísmo negativa, que es vivo reflejo del espectro de absorción correspondiente, donde las bandas vibracionales de la estructura fina del espectro se traducen en las inflexiones correspondientes en el espectro de dicroísmo circular, el espectro de H1 de *Ceratitidis* estructurada exhibe un pequeño máximo a 287 nm y un mínimo a 266 nm (figura 49). Este hecho, aunque será motivo de una discusión más estricta, a la vista de los resultados posteriores de titulación de tirosinas, sugiere ya en principio que las dos tirosinas de la histona de insecto tienen contribuciones opuestas al espectro de dicroísmo circular en la región del UV próximo, cosa que puede ocurrir por varias razones, como se discutirá posteriormente.

Por otro lado, en la figura 48 se observa que el espectro de dicroísmo circular de ambas histonas en KF 0.08 M es prácticamente el mismo. Es decir, hasta 0.08 M en KF la estructuración de H1 de timo y H1 de insecto parece seguir el mismo camino, mientras que a partir de este valor de fuerza iónica los espectros empiezan a diferir cualitativa y cuantitativamente. Estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos por espectroscopía de diferencia (apartado 3.4.1.1.). Suponiendo que uno de los dos residuos de tirosina de *Ceratitidis* esté localizado en un entorno similar al de la tirosina de timo, sufriría una estructuración parecida por la adición de sal. Esto indicaría que la transición  $^1L_b$  del segundo residuo de tirosina ni es ópticamente activa, ni tiene influencia en la actividad de la primera tirosina en KF 0.08 M. Este valor de fuerza iónica concuerda bastante bien con la discontinuidad observada entre 0.06 M y 0.1 M en la curva de  $\Delta A_{285}$  frente a (KF) en los espectros de diferencia de H1 y PRT de insecto y que sirve de evidencia adicional a este resultado. La influencia del segundo residuo de tirosina aparece en el espectro de dicroísmo circular cuando la concentración de sal es superior a este valor (curva e, figura 48). Este resultado, además, está en apoyo de la no cooperatividad de las transiciones inducidas por la fuerza iónica como ya se apuntaba anteriormente, pues, aunque una curva hiperbólica no significa

la ausencia de procesos todo-nada, sin embargo, el que existan entornos moleculares que se estructuren antes (el de la primera tirosina) y entornos que se reorganicen más tarde (el de la segunda tirosina), sí parece indicar la ausencia de estos procesos en la estructuración por sal de las histonas y sus correspondientes PRTs.

La representación gráfica de la  $[\theta]_{277}$  frente a la concentración salina en H1 de timo da una curva hiperbólica, como se observa en la figura 50, resultado que vuelve a estar de acuerdo con la ausencia de procesos cooperativos en la estructuración inducida por sal. La presencia de dos residuos de tirosina en H1 de insecto causa dificultades en el análisis de los datos de la variación de  $[\theta]_{267}$  y  $[\theta]_{287}$  con la fuerza iónica, ya que a valores de concentración salina superiores a 0.08 M en KF comienza a presentar su influencia en el espectro el segundo resto de tirosina y puesto que su contribución parece ser opuesta al de la primera tirosina, la suma de estas dos contribuciones puede ser la causa de las anomalías que se observan en la curva (figura 50).

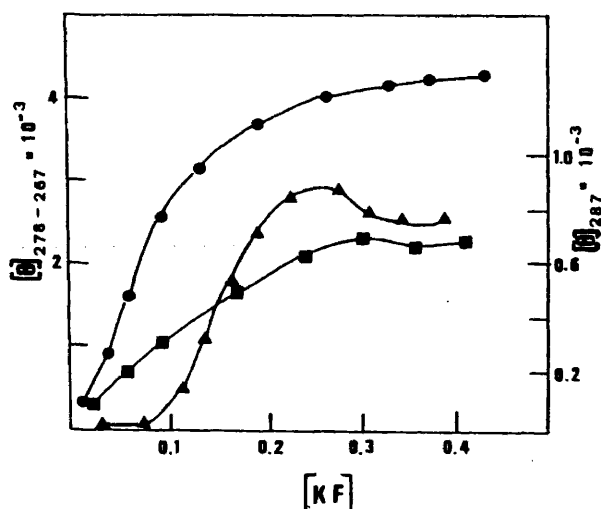


Figura 50. Representación gráfica de la variación de  $[\theta]_{278}$  con la (KF) de histona H1 de timo (●) y de la variación de  $[\theta]_{267}$  (■) y  $[\theta]_{287}$  (▲) con la (KF) de H1 de *Ceratitidis*.



#### 3.4.1.3. TITULACION DE LOS RESIDUOS DE TIROSINA

Los anteriores resultados sobre el plegamiento de las histonas inducido por el pH, detectado por medidas de dicroísmo circular en el UV lejano y discutidas en el apartado 3.3.1., sugieren que se podrán obtener efectos similares si se estudia la dependencia de la transición  $^1L_b$  de la tirosina con la variación del pH.

En la figura 51 se muestran algunos de los resultados obtenidos en este sentido. La representación gráfica de la  $[\theta]_{277}$  de H1 de timo con el pH muestra una pequeña, pero importante variación entre pH 2.8 y 8.0. Smerdon e Isenberg (1976) observaron un incremento similar en la intensidad y anisotropía de fluorescencia para la H1 de timo en ese margen de pH; la titulación de las cadenas laterales de aminoácidos ácidos podría ser la responsable de estos efectos. Entre pH 8.0 y 10.0 ocurre un cambio cooperativo, que está de acuerdo con los resultados encontrados por Smerdon e Isenberg (1976), y que pudiera ser debido al progresivo decrecimiento de la movilidad de la tirosina con la estructuración de la proteína. Las medidas similares realizadas con el PRT de H1 de timo de ternera, recogidas en la figura 51, demuestran que la transición es menos cooperativa que en la molécula intacta. Esta conclusión está de acuerdo con los resultados que se mostraron en la figura 36, discutida en el apartado 3.3.1. y puede ser explicada de la misma forma.

Las señales de dicroísmo circular a 277 nm toman un mínimo a pH 10.0; esto evidentemente se debe a la titulación de los grupos fenólicos de las tirosinas, puesto que las histonas y sus PRTs están todavía plegados a pH 12.0 (figura 36). Esto tiene la ventaja de que permite calcular los valores de  $pK'_a$  de los residuos de tirosina también por este procedimiento, como se muestra en la tabla XVII. Estos valores también se determinaron, y de forma más precisa, por la variación con el pH de la  $[\theta]_{250}$  (figura 51), longitud de onda donde la banda  $^1L_a$  de la tirosina se desplaza como consecuencia de la ionización de su grupo fenólico (Pflumm y Beychok, 1969). Asimismo, se realizaron otros cálculos adicionales, por medida del  $\Delta A_{243}$  y  $\Delta A_{293}$  en los espectros de diferencia obtenidos con la variación del pH. La tabla XVII muestra la corresponden

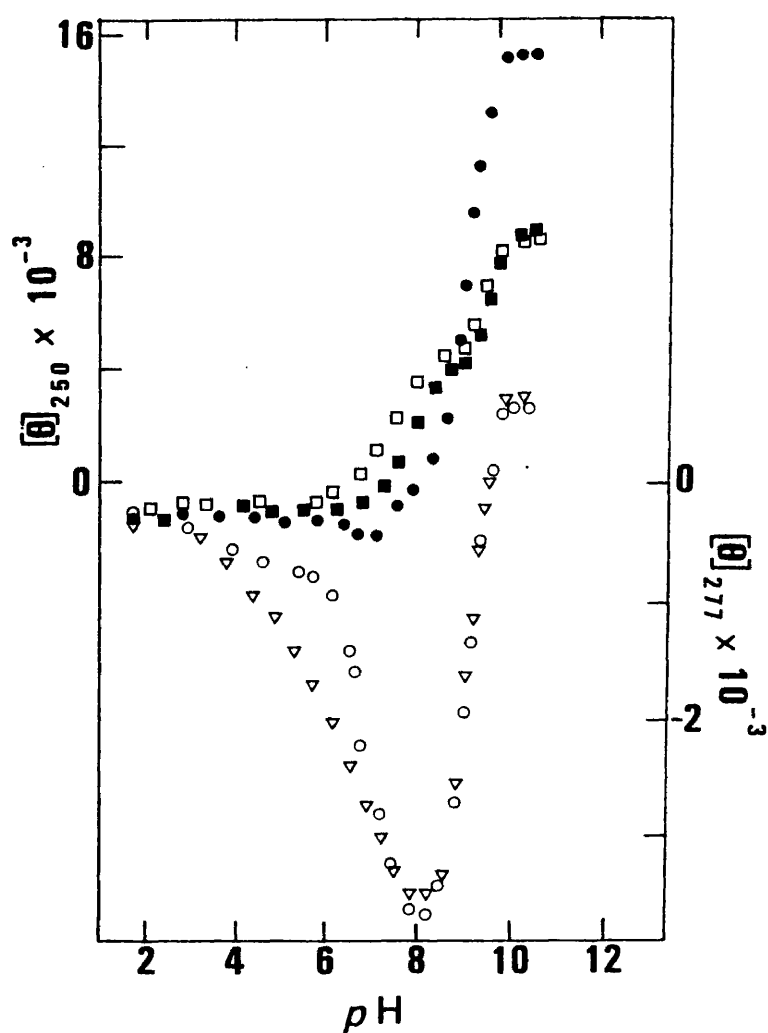


Figura 51. Variación de las elipticidades molares (grados  $\times$   $\text{cm}^2 \times (\text{dmol de proteína})^{-1}$ ) de las histonas H1 y sus PRTs a dos longitudes de onda (250 y 277 nm) en función del pH. (○)  $[\theta]_{250}$  de PRT de timo en agua; (■)  $[\theta]_{250}$  de PRT de insecto en agua; (□)  $[\theta]_{250}$  de PRT de insecto en presencia de KF 0.3 M; (●)  $[\theta]_{277}$  de H1 de timo en agua; (▽)  $[\theta]_{277}$  de PRT de timo en agua. Nótese que las escalas de  $[\theta]_{250}$  y de  $[\theta]_{277}$  son diferentes.

cia de los valores de  $pK'_a$  determinados por estas diferentes técnicas, ambos en presencia y ausencia de KF 0.3 M.

TABLA XVII: Valores de  $pK'_a$  de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina de H1 de timo de ternera y *Ceratitidis capitata*.

Histona	Método	$pK'_a$			
		Tirosina T		Tirosina C	
		Sin sal	KF 0.3M	Sin sal	KF 0.3M
H1 timo de ternera	$[0]_{250}$	11.20	11.25		
	$[0]_{277}$	11.15	11.15		
	$\Delta A_{243}$	11.15	11.30		
	$\Delta A_{293}$	11.30	11.30		
PRT timo de ternera	$[0]_{250}$	11.20	11.30		
	$[0]_{277}$	11.15	11.15		
	$\Delta A_{243}$	11.30	11.30		
	$\Delta A_{293}$	11.25	11.35		
H1 <i>Ceratitidis capitata</i>	$[0]_{250}$	11.40	11.30	9.40	ND <sup>a</sup>
	$[0]_{277}$	11.20	11.20	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
	$\Delta A_{243}$	11.30	11.20	9.20	9.70
	$\Delta A_{293}$	11.30	11.20	9.30	9.80
PRT <i>Ceratitidis capitata</i>	$[0]_{250}$	11.25	11.40	9.20	9.90
	$[0]_{277}$	11.20	11.25	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
	$\Delta A_{243}$	11.30	11.40	9.20	9.80
	$\Delta A_{293}$	11.20	11.30	9.30	9.80

<sup>a</sup> ND No determinado

Como se observa en esta tabla, el  $pK'_a$  del grupo fenólico de la única tirosina de H1 de timo es anormalmente alto, resultado totalmente lógico, si se tiene en cuenta que el residuo de tirosina está orientado hacia el interior de la región globular en la proteína estructurada y a pH 10.0 ya está totalmente estructurada (figura 36). Este resultado está de acuerdo con los obtenidos por resonancia magnética nuclear por Chapman et al. (1978). El incremento de fuerza iónica no tiene influencia apreciable en el valor del  $pK'_a$  de este residuo de tirosina. También este hecho es fácilmente explicable ya que la tirosina de H1 de timo está hacia el interior, rodeada de restos hidrofóbicos, además al pH al que se empieza a titular, ya está casi totalmente estructurada la histona, como ya se ha comentado, de aquí que su valor de  $pK'_a$  no venga influenciado por el aumento de fuerza iónica.

La titulación, por dicroísmo circular a 250 nm, de los residuos de tirosina de la histona H1 de *Ceratitidis capitata* y su PRT, da lugar a una curva bifásica, demostrando que cada tirosina se titula independientemente (ver figura 51). La elipticidad a 250 nm en el punto final de la curva de titulación (pH 12.5) es menor que en el caso del PRT de timo. Esto no es en absoluto sorprendente, ya que a esta longitud de onda comienza a tener gran importancia la participación del enlace peptídico, y las pequeñas diferencias existentes en estructura secundaria entre las moléculas de timo de ternera y *Ceratitidis capitata* pueden afectar mucho a las transiciones  $^1L_a$  de los residuos ionizados de tirosina, con lo cual pueden darse resultados de este tipo.

La posibilidad de que el signo de la fuerza rotacional sea opuesto para los dos residuos de tirosina ionizados de H1 de insecto puede ser excluida, primero por la presencia de dos etapas claramente visibles en la titulación, en la figura 51, y en segundo lugar, otro resultado que descarta esta hipótesis es el continuo incremento que se observa en la elipticidad según se van aumentando los valores del pH del medio, hecho que se ponía de manifiesto en los espectros de diferencia recogidos con la variación del pH, de la histona H1 y PRT de insecto.

Uno de los residuos de tirosina, que se ha denominado tirosina T, por similitud con timo, en la tabla XVII, tiene un comportamiento similar a la tirosina de H1 de timo. El segundo residuo de tirosina de H1 de insecto, que se ha llamado tirosina C, es, sin embargo, marcadamente diferente. Este segundo residuo de tirosina se titula con un bajo  $pK'_a$ , típico de una tirosina situada en un entorno cargado positivamente. Además de esto, el valor del  $pK'_a$  de la segunda tirosina depende bastante de la fuerza iónica (ver tabla XVII).

Si consideramos todos estos resultados, podemos tener ya una evidencia de que la tirosina T de la histona de insecto está hacia el interior de la región globular y que al parecer la tirosina C está en la superficie del PRT de la histona de insecto, puesto que su  $pK'_a$  se altera de forma significativa por la fuerza iónica. Si estas suposiciones son correctas, el residuo de tirosina que se encuentra en un entorno similar a la tirosina 72 de la histona de timo, se titulará con un  $pK'_a$  parecido, y no se verá afectado por un aumento de la fuerza iónica, como ocurre en realidad, mientras que el segundo residuo se titula con un  $pK'_a$  de 9.2.

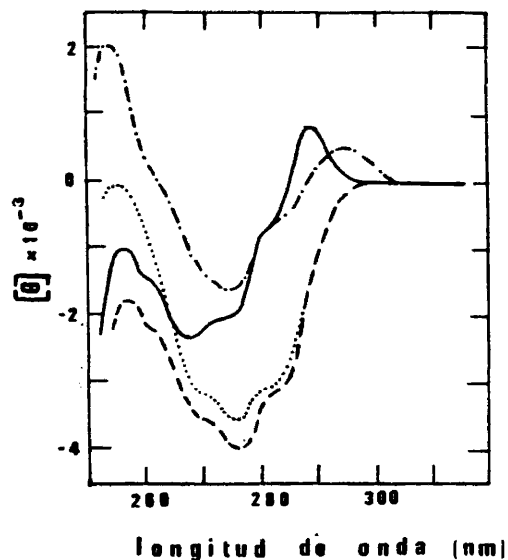


Figura 52. Espectros de dicroísmo circular (UV próximo) de soluciones de las histonas H1 en presencia de KF 0.3 M. (---) H1 de timo, pH 6.0; (.....) H1 de timo, pH 10.2; (—) H1 de *Ceratitidis*, pH 6.0 (— · —) H1 de *Ceratitidis*, pH 10.2.

El resultado experimental que se muestra en la figura 52 demuestra que esta suposición es acertada. En H1 de timo hay un pequeño cambio en la elipticidad a 277 nm en el paso de pH 6.0 a 10.2 en presencia de KF 0.3 M, que es debido a la parcial ionización del grupo fenólico. Es importante destacar que, en el presente experimento, se mantuvo la concentración salina a 0.3 M en KF para que la proteína estuviese estructurada mientras se variaba el pH, de forma que no tengan lugar cambios estructurales al aumentar el pH que oculten los cambios debidos a la ionización de los grupos fenólicos de las tirosinas. La ionización del residuo de tirosina de H1 de timo a pH 10.2 únicamente era de un 10%, dato que se calculó usando la ecuación de Henderson-Hasselbalch, teniendo en cuenta que el  $pK'_a$  de este residuo es 11.25 (tabla XVII).

La transición  $^1L_b$  del cromóforo tirosinato no posee actividad óptica, como se observa por la ausencia de bandas alrededor de los 290 nm en el espectro de dicroísmo circular de la histona de timo, incluso a valores de pH 12.5 (figura 53). Por el contrario, la transición  $^1L_a$  es ópticamente activa, como se demuestra por el incremento de elipticidad a 250 nm (figura 53). Este incremento se utilizó para obtener las curvas de titulación, como se observa en la figura 51.

Como se muestra en la figura 52, existen hechos interesantes en el comportamiento de la histona H1 de insecto, que permiten distinguirla de su homóloga de timo. Se puede observar que a pH 10.2, el residuo de tirosina C está casi totalmente ionizado ( $pK'_a$  de 9.9 en KF 0.3 M, tabla XVII), su grado de ionización es aproximadamente un 85%. Además, la tirosina T, que tiene un  $pK'_a$  idéntico a la de timo, está ionizada a este pH únicamente en un 10%. Como se muestra en la figura 52, a medida que la tirosina C se ioniza, el pequeño máximo de los 287 nm se desplaza hacia 293 nm, indicando que su forma tirosinato posee actividad óptica; este hecho se observa mejor en la figura 54. El perfil del espectro de dicroísmo circular de la histona H1 de insecto a pH 10.2 hacia los 275 nm es cualitativamente semejante a la curva de H1 de timo de ternera; este hecho, lógicamente, es debido a que la casi total ionización del residuo de tirosina C a este pH hace que apenas si se note la

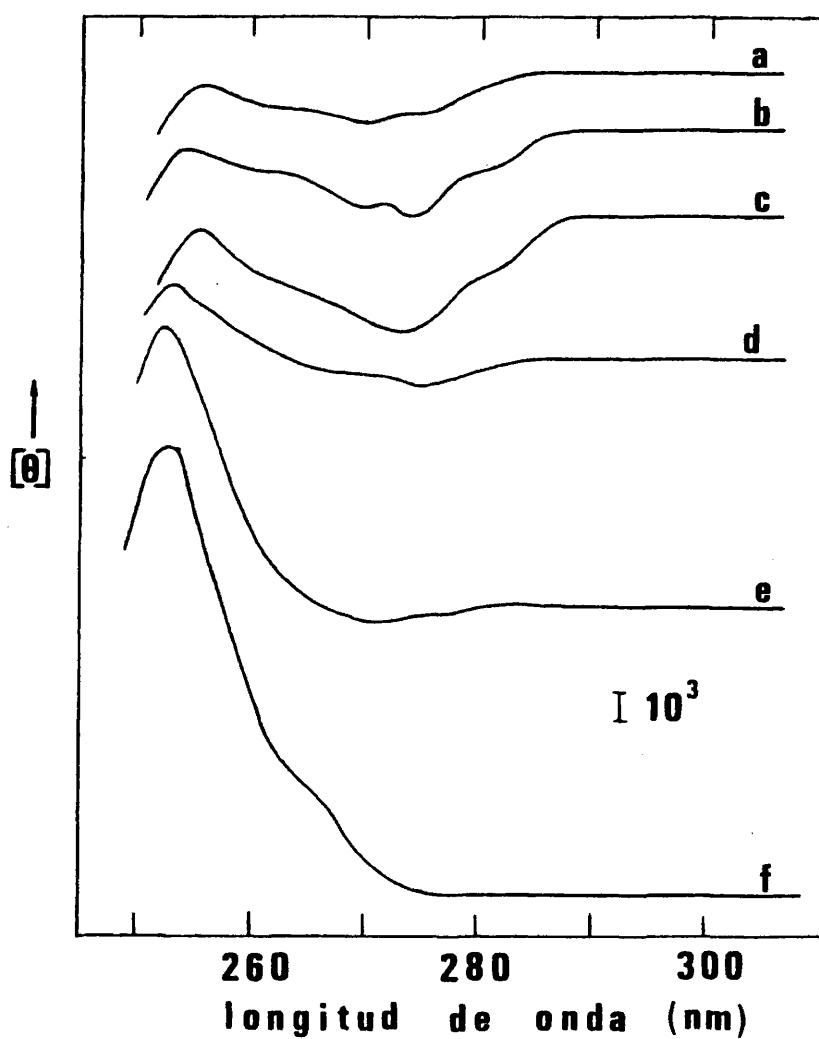


Figura 53. Espectros de dicroísmo circular (UV próximo) de la histona H1 de timo de ternera en agua a diferentes valores de pH. (a) pH 6.0; (b) pH 8.7; (c) pH 9.7; (d) pH 10.8; (e) pH 11.4; (f) pH 12.2. Solamente se representan 6 valores de pH para no complicar la figura.

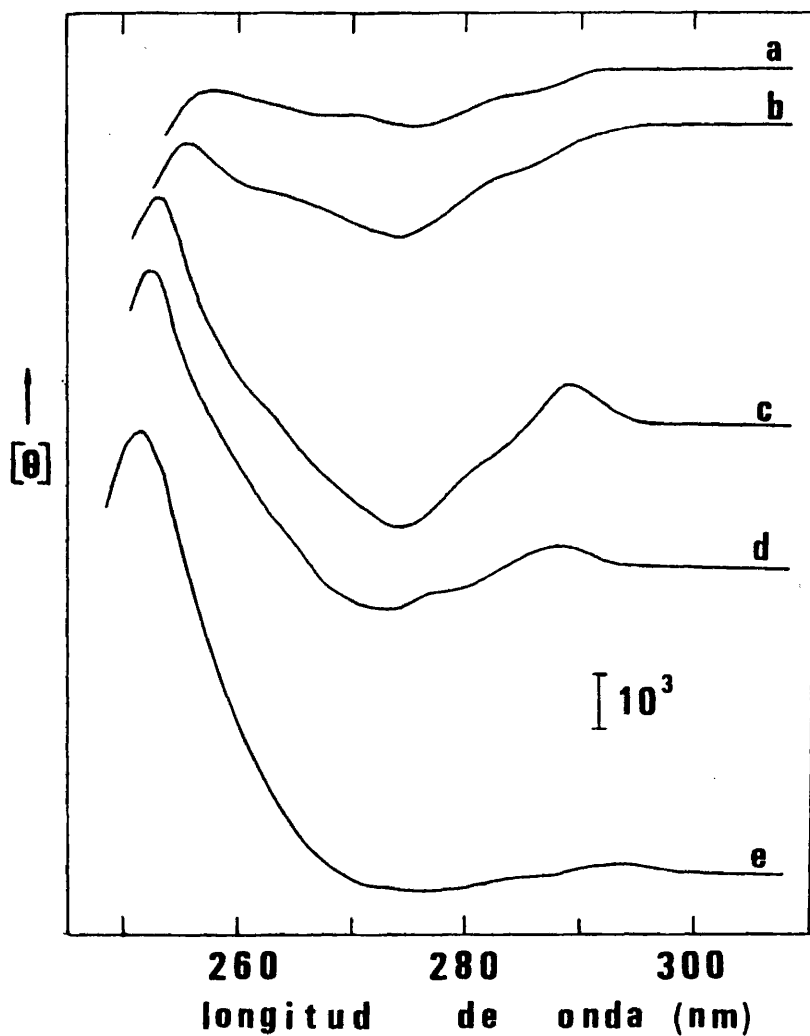


Figura 54. Espectros de dicroísmo circular (UV próximo) de la histona H1 de *Ceratitís capitata* en agua a diferentes valores de pH. (a) pH 4.0; (b) pH 7.2; (c) pH 9.4; (d) pH 11.1; (e) pH 12.7. Al igual que en la figura anterior sólo se representan algunos de los valores de pH utilizados.



influencia del 15% de tirosina C sin ionizar, frente al 90% de tirosina T no ionizada, y de ahí que el mínimo se desplace desde 266 a 275 nm, mostrando entonces una identidad cualitativa con el espectro de timo. Existe, sin embargo, una discrepancia en magnitud que resulta seguramente del solapamiento parcial de las dos transiciones  $^1L_a$  y  $^1L_b$  del residuo de tirosina C en la forma de tirosinato, pero evidentemente estos resultados parecen indicar que el entorno de la tirosina T de H1 de insecto es muy similar al de la tirosina 72 de H1 de timo.

Con los PRTs se obtienen resultados del todo idénticos; el  $pK'_a$  de cada uno de ellos es coincidente con el obtenido en las moléculas paternas y los espectros de dicroísmo circular en esas condiciones (KF 0.3 M, pH 6.0 y pH 10.2) coinciden cualitativa y cuantitativamente con los de las H1 intactas de las que proceden. Esta identidad, junto con los resultados anteriores, viene a demostrar una similar estructuración por sal y pH de la región globular de la molécula aislada en solución y de ésta integrada en la estructura total de la histona.

Los resultados obtenidos hasta aquí apoyan la idea de que uno de los residuos de tirosina de H1 de insecto (tirosina T) está orientado hacia el interior de la región globular hidrofóbica de la molécula cuando ésta se encuentra estructurada por sal, en un entorno similar al de la tirosina 72 de H1 de timo. La relativa similitud de los espectros de diferencia (figura 46), la correspondencia en los valores de  $pK'_a$  y su pequeña o casi nula variación con la fuerza iónica (tabla XVII) son los hechos más evidentes en favor de esta hipótesis. Además, los resultados que se muestran en la figura 48 indican que la estructuración inicial de la histona de insecto, por la adición de sal hasta KF 0.08 M, provocan el movimiento de la tirosina T hacia un entorno más anisótropo, hecho que también viene reflejado en la figura 47, y que puede tomarse como una prueba indirecta de su localización. Debido a la cooperatividad este efecto es despreciable en los experimentos de pH. Por otra parte, el péptido tríptico que contiene la tirosina 72 de timo es muy parecido en su composición y tamaño a uno de los péptidos trípticos que contiene uno de los resi-

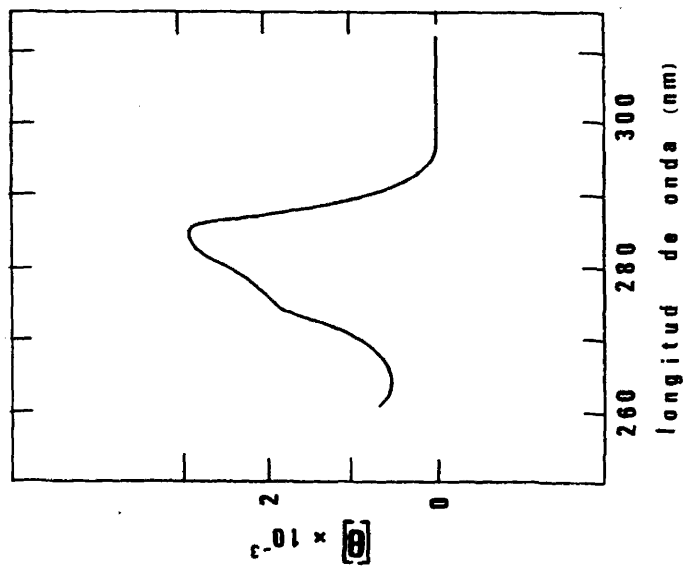


Figura 56. Espectro de dicroísmo circular (UV próximo) resultante cuando se lleva a cabo la diferencia de los espectros de H1 de *Cetátitís capitata* y H1 de timo.

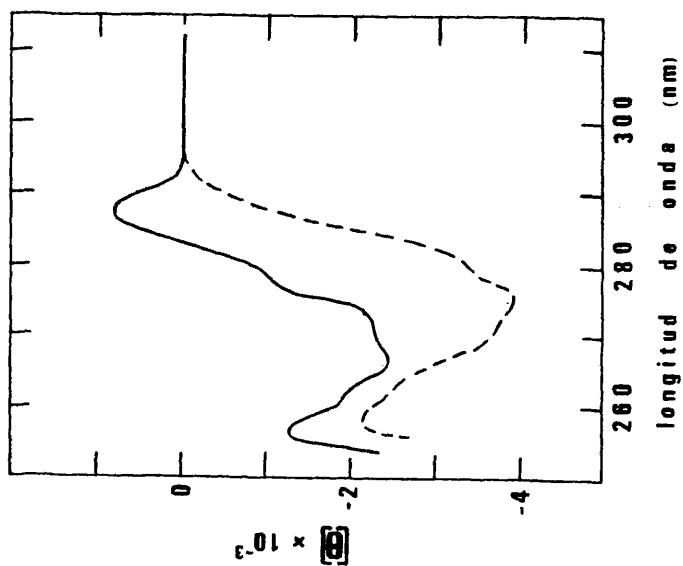


Figura 55. Espectros de dicroísmo circular (UV próximo) de soluciones de las histonas en KF 0.3 M, pH 6.0. (—) H1 de timo de ternera; (---) H1 de *Cetátitís capitata*.

duo de tirosina en H1 de insecto (ver apartado 3.1.9., tabla IX). Este hecho, unido a que este residuo de tirosina está muy conservado en todas las histonas H1 secuenciadas hasta el momento, son asimismo pruebas a favor de esta semejanza estructural de la tirosina T de insecto y la tirosina 72 de timo. El residuo de tirosina C de H1 de insecto parece encontrarse más en la superficie del PRT que en su interior, debido a su bajo  $pK'_a$  y su dependencia con la fuerza iónica (tabla XVII, figura 51). Este residuo se mueve hacia un entorno anisótropo en un último estado de la estructuración de la molécula. La actividad óptica del segundo cromóforo tirosina afecta, por tanto, después de que lo haga la tirosina T (figuras 46 y 48). Si se resta el espectro de dicroísmo circular de la histona H1 de timo estructurada por sal del espectro de H1 de *Ceratitís* en iguales condiciones (figura 55), resultará el espectro de la tirosina C, probándose así que la primera es similar a la de timo. Cuando esto se realizó, resultó una curva positiva, cuyo máximo está alrededor de los 284 nm (figura 56). Esta curva corresponde al espectro de una tirosina cuyo máximo se ha desplazado hacia el rojo, una conclusión, en principio, un tanto absurda para la transición de una tirosina situada en la superficie de la proteína, pero que sin embargo concuerda con el espectro de absorción, ligeramente desplazado hacia el rojo, que se obtenía para la tirosina C, cuando se restaba del espectro de absorción de H1 de *Ceratitís capitata* el de H1 de timo (figura 45).

A la vista de estos datos, otra posible hipótesis es que los efectos Cotton de ambas tirosinas no sean independientes. El acoplamiento de transiciones entre residuos aromáticos puede dar origen a combinaciones de bandas de dicroísmo positivas y negativas (Sears y Beychock, 1973).

#### 3.4.1.4. ESTUDIOS DE ESPECTROFLUORIMETRIA

La interpretación de los resultados, mediante un acoplamiento de los dos residuos de tirosina de la histona H1 de insecto, debe tener un claro reflejo en los espectros de emisión fluorescente de la histona de insecto, por lo que el estudio com-

parativo de la molécula de insecto y timo se hace preciso y necesario en la posible elucidación estructural de los residuos de tirosina de la molécula. Además, esta técnica nos dará información adicional sobre algunos de los resultados anteriormente comentados.

El primer resultado interesante, que se observa al analizar los espectros de emisión fluorescente de las histonas (de timo e insecto), cuando se excitó a 275,5 nm, pH ácido, es que ambas histonas poseen espectros típicos de emisión fluorescente de residuos de tirosina, con un máximo centrado a 300 nm. Sin embargo, la caída del espectro en H1 de *Ceratitidis* es mucho más lenta que en el caso de la histona de timo, y se aprecia un pequeño hombro centrado en 340 nm aproximadamente (figura 57).

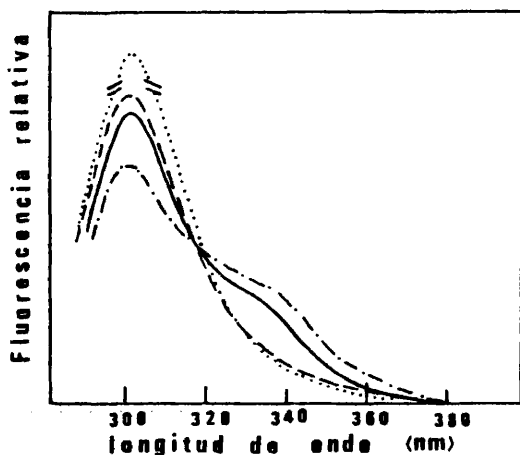


Figura 57. Espectros de emisión fluorescente de las histonas a diferentes fuerzas iónicas. (—) H1 de insecto en agua, pH 3.5; (---) H1 de insecto en KF 0.35 M, pH 6.0; (- - -) H1 de timo en agua, pH 3.5; (.....) H1 de timo en KF 0.35 M, pH 6.0. La longitud de onda de excitación fué en todos los casos 275.5 nm.

Al aumentar la fuerza iónica hasta 0.35 M en KF a pH 6.0 existen hechos bastante significativos. En timo, el espectro se desplaza muy ligeramente hacia el rojo y aumenta mucho la intensidad relativa de fluorescencia, resultados que están de acuerdo con los obtenidos por Smerdon e Isenberg (1976); el espectro es cualitativamente semejante al de la histona a pH ácido. En H1 de insecto el efecto más importante es la acentuación de la banda de emisión fluorescente de 340 nm (figura 57).

En el caso de los PRTs de ambas histonas existen diferencias con las moléculas intactas importantes de comentar. El espectro de emisión fluorescente del PRT de timo no muestra un aumento en la intensidad relativa de fluorescencia, cuando se adiciona sal, tan grande como el de la H1 intacta. Este resultado puede indicar que el residuo de tirosina 72 de timo tiene más quenching en el PRT estructurado que en la molécula intacta en las mismas condiciones. En el PRT de insecto, la estructuración por sal lleva consigo la aparición de un verdadero pico de emisión fluorescente a 340 nm (figura 58).

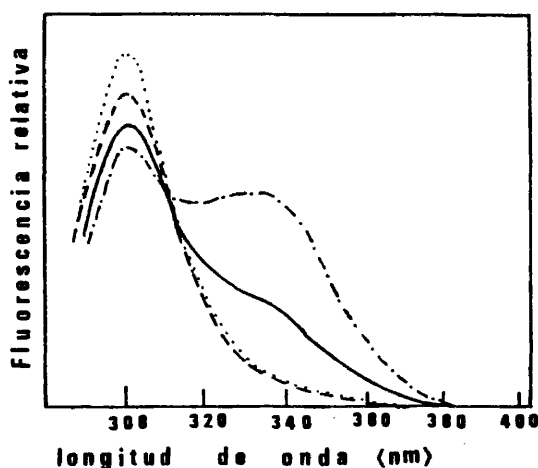


Figura 58. Espectros de emisión de fluorescencia de los PRTs a diferentes fuerzas iónicas. (---) PRT de timo en agua, pH 4.0; (-·-) PRT de timo en KF 0.35 M, pH 6.0; (—) PRT de insecto en agua, pH 4.0; (-·-) PRT de insecto en KF 0.35 M, pH 6.0. La longitud de onda de excitación fué en todos los casos 275.5 nm.

Por otra parte, y con el fin de comprobar esta diferencia entre timo e insecto, se realizaron los correspondientes espectros de excitación de las histonas, fijando la longitud de onda de emisión en 300 y 340 nm (longitudes de onda correspondientes a los dos máximos de emisión fluorescente observados en H1 y PRT de *Ceratitidis*). Estos resultados se muestran en la tabla XVIII.

Mientras que en H1 y PRT de timo se encuentra un solo máximo de excitación a 275.5 nm para estas dos longitudes de onda de emisión, resultado lógico ya que sólo posee un fluoróforo capaz de emitir a esta longitud de onda, en H1 y PRT de insecto se aprecian dos máximos de excitación distintos a 275.5 nm y 278.5 nm

en el caso de H1 para las emisiones de 300 y 340 nm respectivamente, cuando la molécula está disuelta en agua a pH ácido. Esto pone de manifiesto la existencia de dos fluoróforos claramente distintos en H1 de insecto.

TABLA XVIII: Longitudes de onda correspondientes a los máximos de los espectros de excitación de las histonas y sus correspondientes PRTs en diferentes condiciones.

Histona	Condiciones	Longitud de onda de excitación, cuando la longitud de onda de emisión se fijó en:	
		300 nm	340 nm
H1 timo de ternera	Agua, pH 3.4	275.5	275.5
	KF 0.35 M, pH 6.0	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
H1 <i>Ceratitidis</i> <i>capitata</i>	Agua, pH 3.4	275.5	278.5
	KF 0.35 M, pH 6.0	ND <sup>a</sup>	279
PRT timo de ternera	Agua, pH 4.0	275	275.5
	KF 0.35 M, pH 6.0	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>
PRT <i>Ceratitidis</i> <i>capitata</i>	Agua, pH 4.0	275	280
	KF 0.35 M, pH 6.0	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>

<sup>a</sup>ND No determinado.

La ausencia de triptófano en H1 de *Ceratitidis* (resultado ya discutido en el apartado 3.4.1.1.) indica que el fluoróforo responsable de la banda de emisión de 340 nm, que se observa muy acentuada en el PRT en KF 0.35 M, pH 6.0, deber ser una de las dos tirosinas presentes en la molécula de insecto. Rayner et al. (1978) estudiaron la emisión fluorescente de polipéptidos modelo, en dife

rentes condiciones. Sus resultados en este sentido les llevaron a sugerir que los residuos de tirosina que se encuentran en entornos fuertemente básicos en proteína son capaces de presentar máximos de emisión fluorescente desplazados hacia el rojo a pH neutro, de forma similar a la tirosina ionizada.

Teniendo en cuenta esta posibilidad, que las histonas son proteínas muy básicas, y que la tirosina C de H1 de insecto posee un  $pK'_a$  bajo y dependiente de la fuerza iónica, típico de tirosinas situadas en entornos cargados positivamente, la hipótesis más probable es que esta banda de emisión fluorescente con máximo a 340 nm sea debida a la emisión de fluorescencia de la tirosina C presente en H1 de insecto.

Además, el máximo de excitación de este segundo fluoróforo se encuentra desplazado hacia el rojo en relación con la otra tirosina de insecto y la tirosina de timo, resultado que se correlaciona con el espectro de absorción calculado para la tirosina C de *Ceratitis* por diferencia entre el espectro de absorción de H1 de *Ceratitis* y de H1 de timo (figura 45), y que serviría de prueba adicional en favor de esta hipótesis.

La presencia de residuos básicos, cercanos a la tirosina C en la escasa estructura terciaria que presenta la proteína a pH ácido, podría ser la causa de su espectro de absorción ligeramente desplazado hacia el rojo y de su emisión fluorescente desplazada hacia la zona de emisión del tiosinato (figuras 45 y 57, respectivamente). El aumento de fuerza iónica provoca una estructuración de la proteína, a la vez que se observa una acentuación y desplazamiento hacia el rojo (aproximadamente a 343 nm) de la banda de emisión fluorescente anómala. Este resultado podría explicarse por una mayor influencia de los residuos cargados sobre la tirosina C en la estructura final, que diera cuenta de un desplazamiento hacia el rojo de su máximo de excitación (tabla XVIII) y por tanto un mayor desdoblamiento de las bandas de emisión fluorescente de 300 y 343 nm. En H1 de timo, como ya se comentó en la introducción, Chapman et al. (1978) demostraron que los residuos cargados del fragmento "Tr-Tr" de la histona se encuentran expues

tos hacia el medio, cuando este péptido se estructura por sal.

Mediante esta hipótesis, sobre la influencia de residuos cargados en el entorno de la tirosina C de H1 de insecto, se justificaría asimismo el resultado citado en el apartado anterior, cuando se realizaba la diferencia entre los espectros de dicroísmo circular en el UV próximo de H1 de *Ceratitis* y H1 de timo, y se observaba un espectro de dicroísmo circular típico de tirosinas, desplazado hacia el rojo (figura 56). Es decir, el paso hacia un entorno anisótropo de la tirosina C de insecto a valores superiores de 0.08 M en KF vendría condicionado por la influencia de residuos básicos de la histona sobre el residuo de tirosina C, y esta influencia sería la causa de su espectro de dicroísmo circular desplazado hacia el rojo, sin necesidad de recurrir al solapamiento de los efectos Cotton de ambas tirosinas en H1 de insecto. De esta manera, el entorno fuertemente básico de la tirosina C explicaría su bajo  $pK'_a$  y la variación del mismo con el aumento de la fuerza iónica.

De las dos hipótesis que se comentaban al principio de estos estudios (apartado 3.4.1.1.), parece más probable la hipótesis a. La tirosina T de insecto sufre cambios de entorno, al estructurarse la proteína por sal, muy similares a los que tienen lugar en la tirosina 72 de timo. La tirosina C, por el contrario, que en condiciones no estructurantes (agua, pH ácido) posee ya un espectro de absorción ligeramente desplazado hacia el rojo (figura 45), presumiblemente por su localización en una región muy básica de la proteína, comienza a estructurarse a valores de concentración en KF superiores a 0.08 M, que es cuando empieza a notarse su efecto en el espectro de dicroísmo circular y donde se aprecia un salto en la curva de  $\Delta A_{285}$  frente a la (KF), (figura 47). La estructuración de la tirosina C la lleva a una localización en la superficie de la molécula con un entorno cargado positivamente, por lo que esta tirosina presenta un espectro de emisión fluorescente desplazado hacia la zona del tirosinato y muestra un espectro de dicroísmo circular también desplazado hacia el rojo. Estos desplazamientos en ambas tirosinas de H1 de insecto, como consecuencia de la estructuración por sal, provocarían la aparición de espectros de



diferencia cuantitativamente muy similares a los de timo, pero cualitativamente diferentes, como en realidad ocurre (figura 46).

#### 3.4.2. INFLUENCIA DEL SDS

Los resultados de estructura secundaria de las histonas en presencia de SDS han puesto de manifiesto una reorganización de las proteínas H1 de timo y *Ceratitidis* prácticamente idéntica, como consecuencia de la adición del detergente que induce en ambas una estructura secundaria semejante (ver tabla XIV). Este dato induce a pensar que la realización de un estudio estructural de las dos histonas y sus zonas globulares aisladas, en presencia del detergente, utilizando fundamentalmente las mismas técnicas que en el apartado anterior, con fines comparativos, puede ayudar a comprender con más exactitud los resultados que hasta entonces se poseían.

##### 3.4.2.1. ESPECTROSCOPIA DE DIFERENCIA

En este estudio se obtuvieron los espectros de diferencía de las histonas, producidos por la adición de SDS, en un caso con las proteínas disueltas en agua a pH ácido y en otros disueltas en NaCl 0.35 M, pH 6.0, previamente, tal y como se ha descrito en el apartado 2.8.1. La utilización de NaCl en vez de KF tiene la desventaja de que se obtiene mayor ruido en los espectros de dicroísmo circular, pero fué necesario su uso, ya que el dodecilsulfato potásico, que se forma en el medio de reacción si se utiliza KF, es insoluble en medio acuoso.

Los espectros de diferencia obtenidos por adición de SDS, cuando las histonas se encuentran disueltas en agua a pH ácido, se muestran en la figura 59. Cualitativamente, los espectros indican que el detergente produce transiciones conformacionales tales que los residuos de tirosina pasan a un entorno más apolar. En el aspecto cuantitativo se observa que, mientras en timo el  $\Delta\epsilon_{285}$  es aproximadamente  $700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , correspondiente, como ya se ha comentado, a la transición de un residuo de tirosina, en *Cerati-*

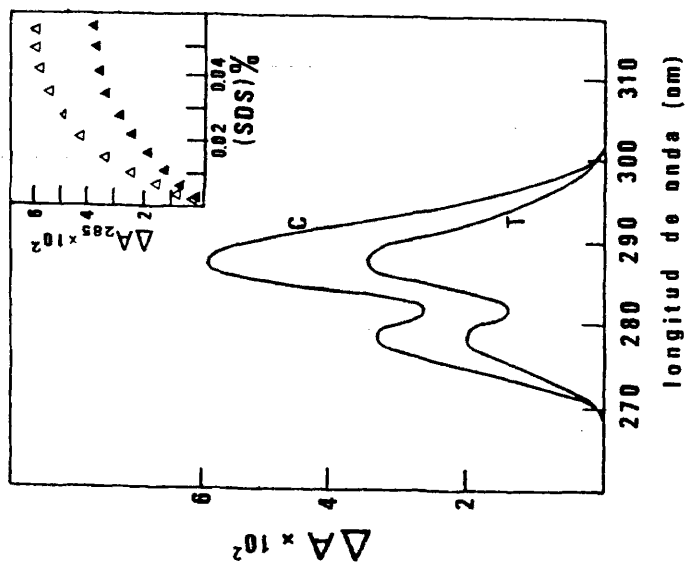


Figura 59. Espectros de diferencia de las histonas H1 disueltas en agua a pH ácido y posterior adición de SDS hasta 0.05% (p/v). (C) *Cetaditís*; (T) Timo. En el recuadro se muestra la variación de  $\Delta A_{285}$  con la (SDS). ( $\Delta$ ) *Cetaditís*; ( $\blacktriangle$ ) Timo.

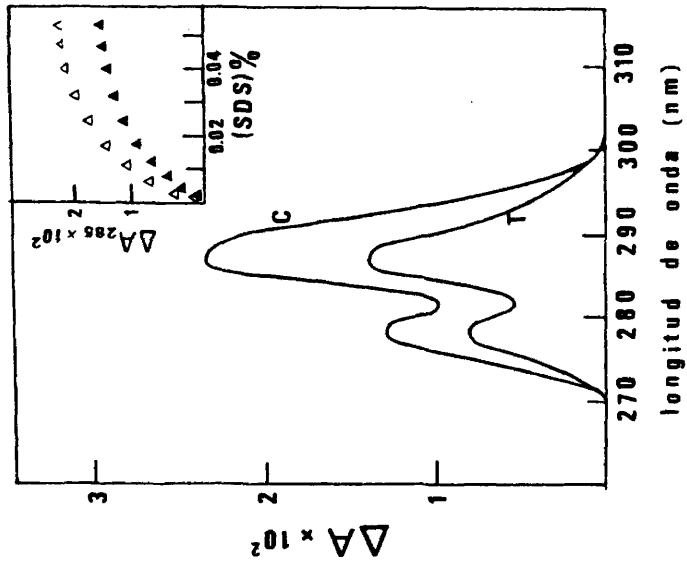


Figura 60. Espectros de diferencia de las histonas H1 disueltas en NaCl 0.35 M, pH 6.0 y posterior adición de SDS hasta 0.05% (p/v). (C) *Cetaditís*; (T) Timo. En el recuadro se muestra la variación de  $\Delta A_{285}$  con la (SDS). ( $\Delta$ ) *Cetaditís*; ( $\blacktriangle$ ) Timo.

El  $\Delta\epsilon_{285}$  resultó ser  $1300 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , indicando que los dos residuos de tirosina de la molécula sufren esta variación, hecho que no ocurría con la fuerza iónica. Es decir, el SDS produce efectos idénticos en los entornos de los residuos de las dos tirosinas de la molécula de H1 de insecto y parece ser que idénticamente al de la tirosina de timo, resultado que, por otra parte, no es de extrañar, pues la acción de este agente debe ser muy uniforme sobre ambas histonas, y produce igual porcentaje de estructura helicoidal en ellas como se vió y discutió en el apartado de estructura secundaria.

Por otra parte, cuando se recogen los espectros de diferencia, con las histonas disueltas previamente en NaCl 0.35 M, se observa que los desplazamientos hacia el rojo son cuantitativamente menores (figura 60), resultado lógico si se tiene en cuenta que las proteínas ya se encuentran estructuradas por sal. En todos los casos, y al igual que ocurría en la estructuración inducida por la fuerza iónica, la representación del  $\Delta A_{285}$  frente a la concentración de SDS es hiperbólica, consiguiéndose el máximo a concentraciones de 0.04-0.05% (p/v) en SDS.

Los resultados obtenidos con los PRTs fueron idénticos, pudiéndose deducir, por tanto, conclusiones semejantes. Los espectros de diferencia en SDS-NaCl no se pudieron realizar, ya que los péptidos precipitaban incluso a concentraciones bajas de SDS.

#### 3.4.2.2. DICROISMO CIRCULAR EN EL UV PROXIMO EN PRESENCIA DE SDS

Los experimentos realizados en este aspecto con el detergente sirven de confirmación de la influencia que el SDS ejerce sobre la estructura de las histonas, ya comentada en los resultados obtenidos por espectroscopía de diferencia y dicroísmo circular en el UV lejano.

La figura 61 muestra la influencia del detergente en el espectro de dicroísmo circular (UV próximo) de las histonas de timo e insecto. Cuando las histonas están disueltas en agua a pH

ácido , como ya se ha discutido en el apartado 3.4.1.2., la fuerza rotacional de los residuos de tirosina es muy baja. La reorganización estructural que sufren las histonas en presencia de cantidades crecientes de SDS lleva consigo la aparición de fuerza rotacional. Según se observa en la figura 61, los espectros de timo y *Ceratitidis* son cualitativamente idénticos, presentando ambos un mínimo a 275-276 nm. El espectro de H1 de insecto no presenta máximo alguno, contrariamente a lo que ocurría cuando la molécula se estructuraba por sal. El espectro de H1 de timo a lo largo de todo el rango de concentraciones del detergente utilizadas presenta aproximadamente la mitad de la elipticidad negativa que tiene el espectro de H1 de insecto. En ambos casos, timo y *Ceratitidis* , los espectros apenas sufren variaciones a partir de 0.04% en SDS.

Cuando se parte de las histonas previamente estructuradas en NaCl 0.35 M, los espectros obtenidos en el estado final (concentración de SDS de 0.06% (p/v)) son idénticos a los obtenidos cuando se partía de las histonas desestructuradas en agua a pH ácido, como se observa en la figura 62.

Lo más significativo de estos últimos estudios de diacrisismo circular, en presencia de SDS, es la pérdida de elipticidad positiva en el espectro de H1 de *Ceratitidis* , en favor de un aumento de elipticidad negativa, y a la vez, un desplazamiento del espectro hacia el rojo (de 266 nm en sal a 275 nm en SDS) (figura 62). Esta disminución progresiva de  $[\theta]_{287}$  da cuenta de la pérdida de la contribución positiva de la tirosina C de insecto, en el paso de sal a SDS 0.06%. En otro sentido, la  $[\theta]_{277}$  del espectro de timo en SDS 0.06% (p/v) se reduce a la mitad de la que llega a alcanzar en KF 0.3 M. La  $[\theta]_{275}$  final en SDS 0.06% (p/v) alcanzada por la histona de *Ceratitidis* es aproximadamente el doble que la de timo en iguales condiciones. Este hecho está de acuerdo con la suposición de que las dos tirosinas de insecto sufren transiciones estructurales idénticas entre sí, e idéntica a la que tiene lugar en el único residuo de tirosina de la histona de mamíferos, en presencia de SDS, hipótesis que ya se indicaba como probable en el apartado anterior.

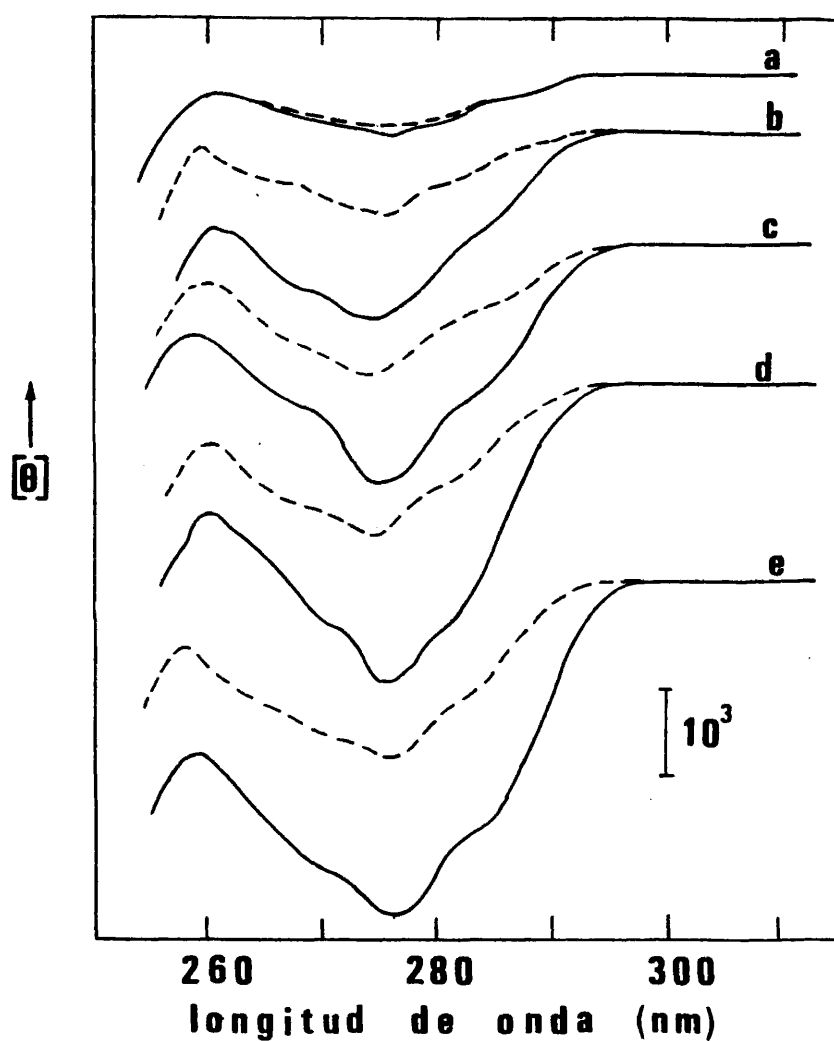


Figura 61. Influencia del SDS en los espectros de dicroismo circular (UV próximo) de las histonas H1 de *Ceratitidis* (—) y H1 de timo (---) disueltas en agua a pH 3.0 (a); SDS 0.005% (p/v) (b); SDS 0.02% (p/v) (c); SDS 0.04% (p/v) (d); SDS 0.06% (p/v) (e).

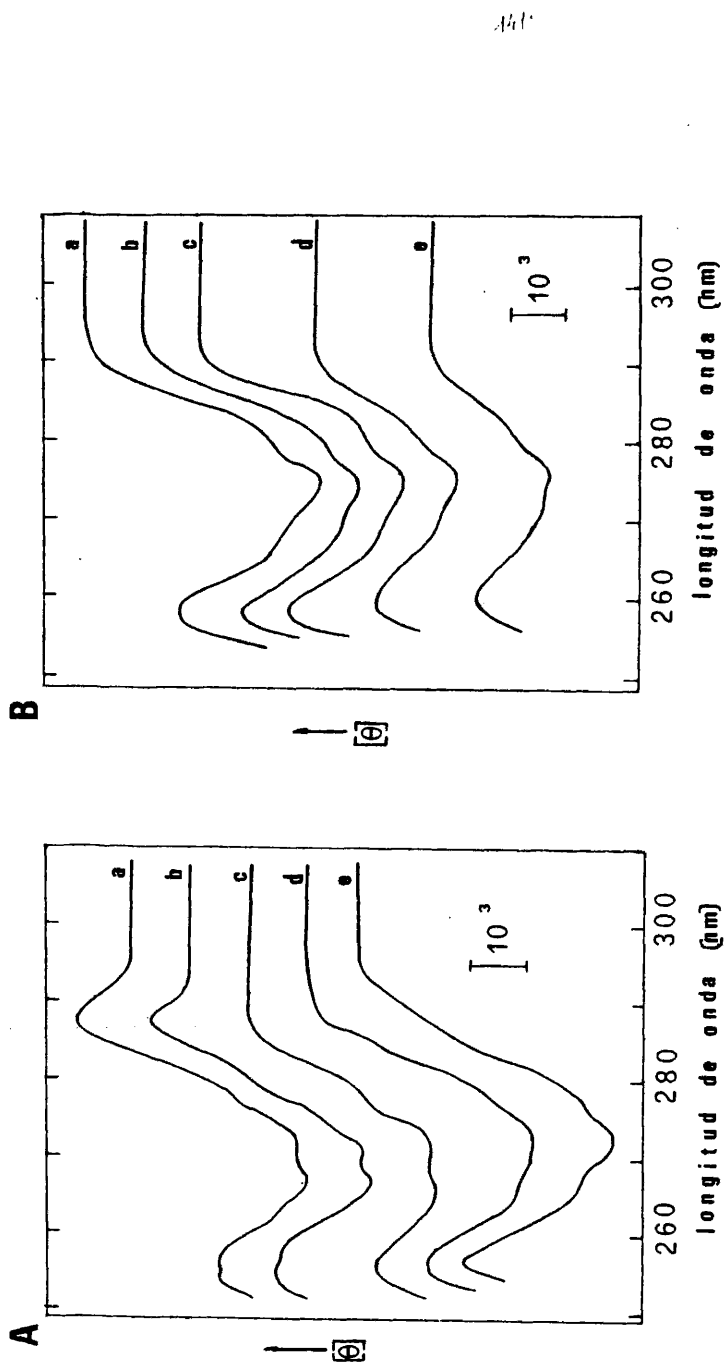


Figura 62. Influencia del SDS en los espectros de dicroísmo circular (UV próximo) de las histonas H1 de *Ceratitidis* (A) y H1 de timo (B) estructuradas por sal. Se partió de las histonas disueltas en NaCl 0.35 M, pH 6.0 (a), y posterior adición de SDS 0.001% (b); SDS 0.01% (c); SDS 0.04% (d); SDS 0.06% (e). La concentración de SDS se expresa en % (p/v).

Con el detergente los residuos de tirosina de las moléculas de H1 de timo e insecto pasan a entornos más apolares, como ya se comentó en los resultados de espectroscopía de diferencia. Sin embargo, la anisotropía de la tirosina de timo se reduce al pasar la histona de estar estructurada en NaCl 0.35 M pH 6.0 a NaCl 0.35 M-SDS 0.06%. Si, como parece probable, suponemos que el residuo de tirosina T tiene una contribución idéntica a la tirosina de timo en el espectro de dicroísmo circular cuando la histona se encuentra estructurada por sal, con lo que el residuo de tirosina C tendrá anisotropía positiva desplazada hacia el rojo (figura 56) y en presencia de SDS ambos residuos (tirosina T y C) contribuyen de igual manera al espectro de dicroísmo circular, entonces también existe una reducción en la anisotropía de las tirosinas de *Ceratitis* en presencia de SDS. Este último hecho se puede calcular sin más que tener en cuenta el valor de elipticidad a 275 nm que alcanzaría el espectro de H1 de insecto, si únicamente cambiara de signo el espectro de la tirosina C y se desplazara hacia el azul (figuras 55 y 56).

Con los PRTs se obtuvieron idénticos resultados en ambos casos, si bien sólo se realizaron los espectros en ausencia de sal.

Es decir, la reorganización estructural que tiene lugar en las moléculas de histonas, como consecuencia de la adición de SDS, provoca una transferencia de los residuos de tirosina a entornos más hidrofóbicos, a la vez que permite una mayor libertad de movimiento de los anillos aromáticos, que en el caso de la estructuración inducida por la fuerza iónica. Este resultado es bastante lógico, si tenemos en cuenta que la estructura nativa probablemente exija una rigidez más estricta en la región globular de la molécula, donde se encuentran los restos de tirosinas de ambas histonas. Existen datos sobre una fuerte inmovilización de la tirosina 72 de timo, cuando la histona se estructura por sal (Chapman et al., 1978).

Lo que sí queda bastante claro a la vista de estos resultados es que, en presencia de SDS, se pierden las diferencias

existentes entre la tirosina T y la tirosina C, en cuanto a su comportamiento en dicroísmo circular. El detergente produce una estructura final en la molécula tal que homogeneiza el comportamiento de las dos tirosinas de H1 de insecto y él de la H1 de timo.

#### 3.4.2.3. EFECTO DEL SDS EN LA TITULACION DE LOS RESIDUOS DE TIROSINA

Puesto que los resultados de estructura secundaria, espectroscopía de diferencia y dicroísmo circular (UV próximo) parecen demostrar una ausencia total de diferencias entre los dos residuos de tirosina de *Ceratitidis*, esta posibilidad debe tener un claro reflejo en los valores de  $pK'_a$  que poseen estos residuos en SDS.

En la figura 63 se observa la variación del espectro de dicroísmo circular en el UV próximo de la histona H1 de timo en SDS 0.06% (p/v) con el pH. Como se deduce de la figura, la transición  $^1L_b$  de la forma tirosinato tampoco es ópticamente activa en SDS 0.06%, mientras que la transición  $^1L_a$  sí lo es, como se pone de manifiesto por el sucesivo aumento de  $[\theta]_{253}$  con el pH.

La figura 64 presenta los resultados que, en el mismo sentido, se han obtenido con la histona H1 de insecto. En este caso, las dos transiciones  $^1L_a$  y  $^1L_b$  de la forma tirosinato de los residuos de tirosina de *Ceratitidis* poseen actividad óptica, como se observa por el aumento de  $[\theta]_{253}$  y  $[\theta]_{293}$  respectivamente. La concentración de SDS utilizada en ambos casos (timo e insecto) fue superior a 0.04%, con el fin de que no se produjesen cambios estructurales, pues a esta concentración ya se ha conseguido la máxima estructuración que induce el detergente, de forma que solamente se manifestasen los efectos debidos a la ionización de los grupos fenólicos de las tirosinas.

El  $pK'_a$  de la tirosina 72 de timo en SDS resultó ser 12.2, y asimismo el  $pK'_a$  de los dos restos de tirosina de H1 de insecto es 12.2. Este valor es anormalmente alto, incluso superior al de la tirosina de timo y tirosina T de *Ceratitidis*, pero no sorprendente, si se tiene en cuenta el desplazamiento hacia entornos



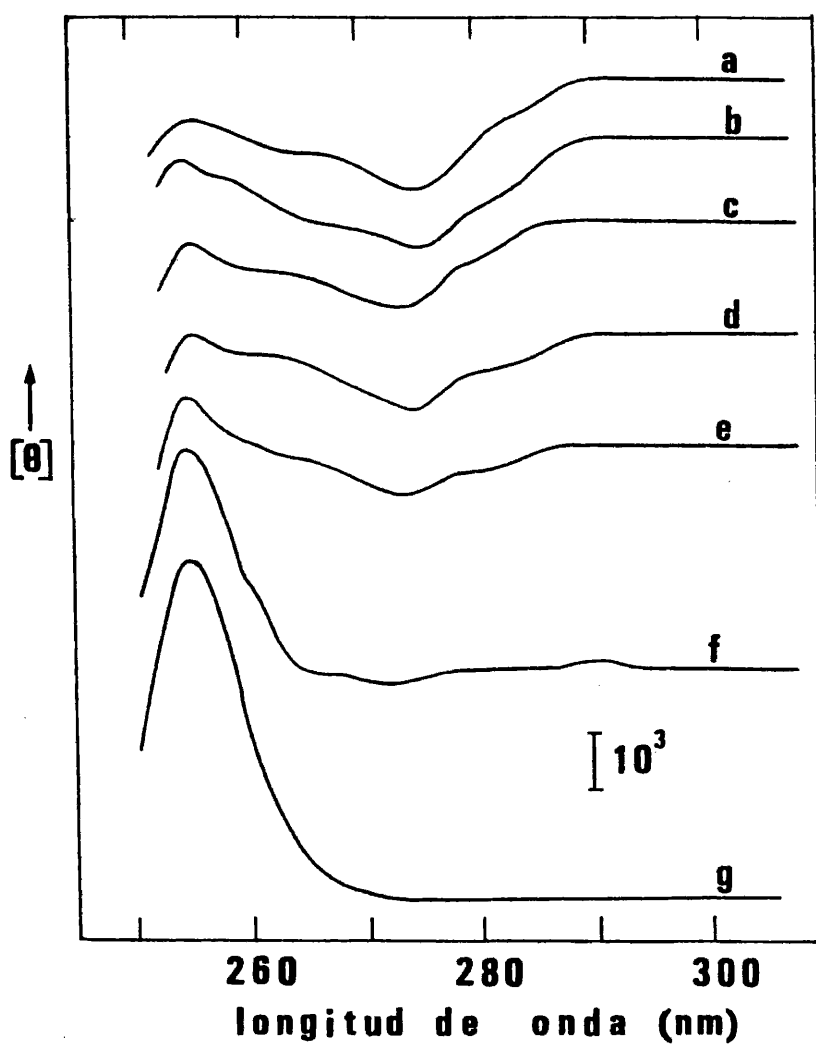


Figura 63. Espectros de dicroísmo circular (UV próximo) de la histona H1 de timo de ternera en SDS 0.06% (p/v) a diferentes valores de pH. (a) pH 6.4; (b) pH 9.2; (c) pH 10.4; (d) pH 10.9; (e) pH 11.3; (f) pH 12.4; (g) pH 13.2.

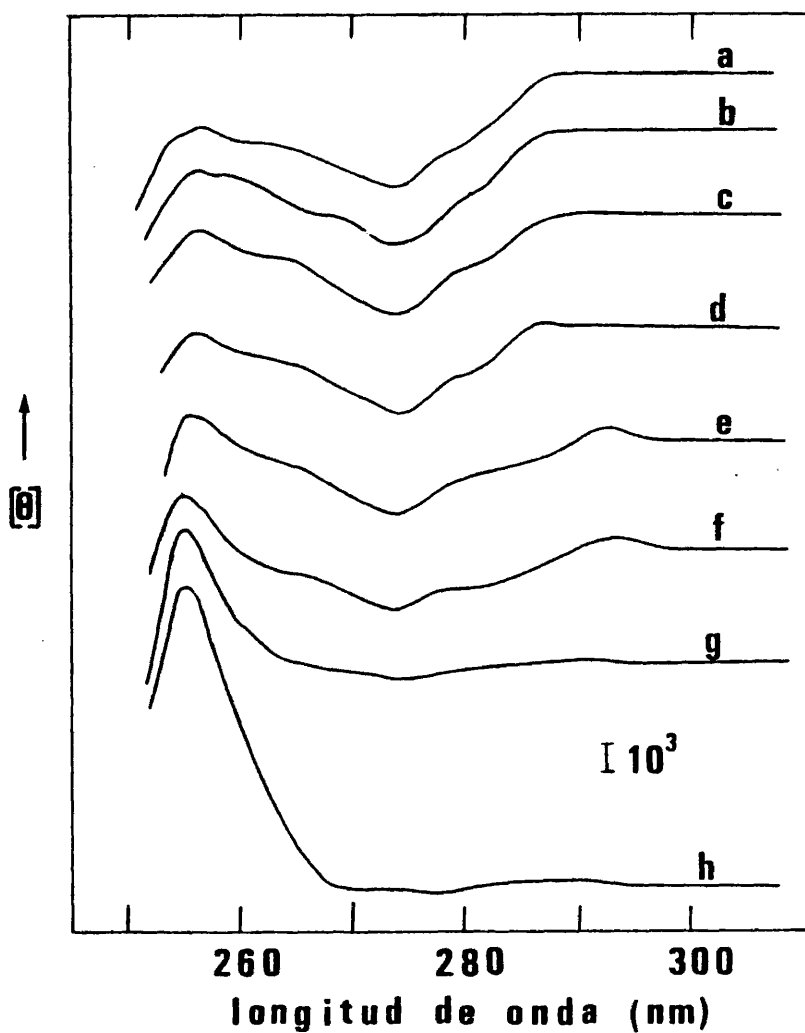


Figura 64. Espectros de dicroísmo circular (UV próximo) de la histona H1 de *Ceratitidis capitata* en SDS 0.06% (p/v) a diferentes valores de pH. (a) pH 3.0; (b) pH 7.0; (c) pH 9.0; (d) pH 11.1; (e) pH 11.45; (f) pH 11.9; (g) pH 12.1; (h) pH 12.6.

muy hidrofóbicos que sufren las tirosinas (figuras 59 y 60) en presencia de SDS. Se aumenta, no solo el  $pK'_a$  de la tirosina T, sino que también lo hace el  $pK'_a$  de la tirosina C de insecto.

La titulación se realizó mediante la medida del  $\Delta A_{243}$ ,  $\Delta A_{293}$  de los espectros de diferencia obtenidos con el pH, y por la variación de la  $[\theta]_{255}$  con el aumento del pH. Este último método se muestra en la figura 65. Lo más significativo de la figura es que, en presencia de SDS, se observa una curva monofásica para la titulación de las tirosinas de la molécula de insecto, en contraposición con la curva bifásica que se obtenía en el caso de la titulación sin SDS (figura 51). Las magnitudes cuantitativas del  $\Delta A_{243}$  y  $\Delta A_{293}$ , no presentes en la figura, coinciden bastante bien con las estimadas para la titulación de dos residuos de tirosina, en el caso de H1 de insecto, siendo éstas aproximadamente el doble que las obtenidas en H1 de timo.

Los resultados obtenidos en este experimento vienen a confirmar una vez más los ya comentados en los apartados anteriores. El SDS, principalmente, neutraliza cargas positivas y homogeneiza el entorno de las tirosinas de insecto, consiguiendo que éstas se titulen con un  $pK'_a$  idéntico e igual al  $pK'_a$  de la única tirosina de timo, que por esta causa debe encontrarse en un entorno muy similar cuando la molécula se encuentra en presencia de SDS. Este resultado, obviamente, es el efecto de una estructura final semejante en ambas histonas, por la adición del detergente, como consecuencia de una distribución similar de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica.

Los PRTs de ambas histonas son insolubles, en las concentraciones requeridas para el experimento, en SDS 0.04% (p/v), en un gran intervalo de pH, por lo que no se pudo llevar a cabo la titulación de los residuos de tirosina en estas moléculas, en presencia del detergente.

#### 3.4.2.4. ESTUDIOS DE ESPECTROFLUORIMETRIA EN PRESENCIA DE SDS

Puesto que en medios que contienen concentraciones re-

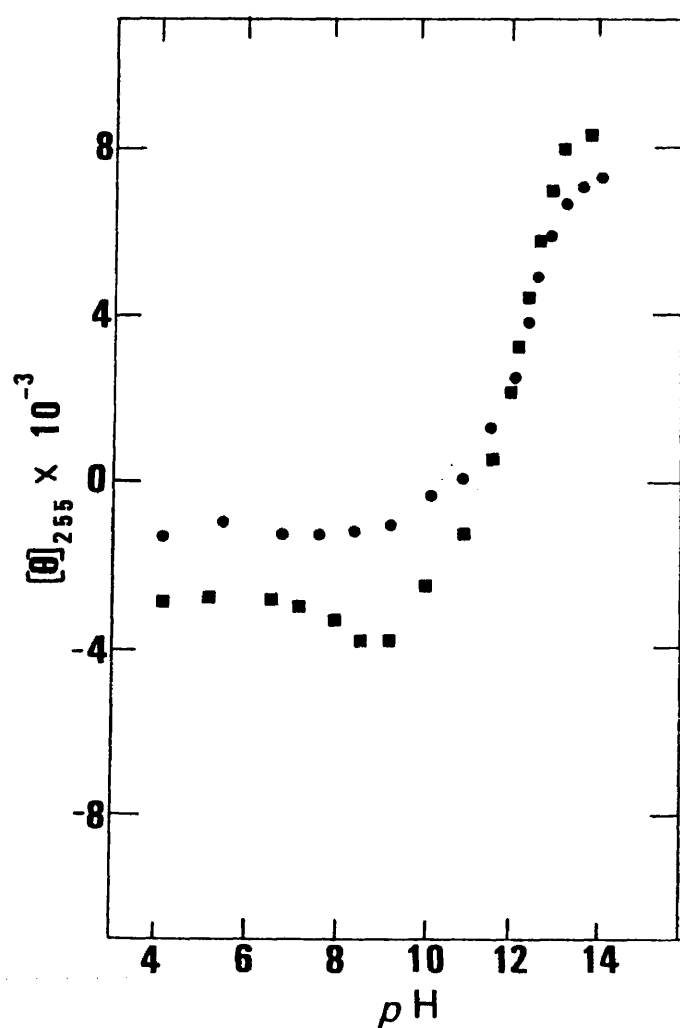


Figura 65. Variación de la elipticidad molar (grados  $\times$   $\text{cm}^2 \times (\text{dmol de proteína})^{-1}$ ) a 255 nm de las histonas H1 de timo (●) y *Ceratitidis capitata* (■) en SDS 0.06% (p/v) en función del pH.

lativamente altas en SDS ( $\geq 0.04\%$ , (p/v)) el comportamiento estructural de la tirosina T y tirosina C de insecto se igualaba, exhibiendo ambos residuos idéntico valor de  $pK'_a$ , la emisión de fluorescencia de la histona de *Ceratitidis*, en estas condiciones, debe reflejar este hecho. Por este motivo, y con objeto de comprobar esta posibilidad, se realizó el espectro de emisión fluorescente de la histona H1 de insecto en presencia de este agente.

Cuando esto se llevó a cabo, se observó que el hombro de emisión fluorescente centrado en los 340 nm, que aparecía cuando la proteína estaba estructurada por sal, desaparece al adicionar, a la histona en NaCl 0.35 M, pH 6.0, SDS hasta 0.1%. El espectro, en estas condiciones, se parece cualitativamente al de H1 de timo (figura 66). También se observa, en la misma figura, un aumento en la intensidad relativa de fluorescencia. Este último resultado probablemente sea debido a que el entorno que rodea a la tirosina C, en presencia de SDS 0.1% (p/v), la proteja más del posible quenching (recordar que esta tirosina está localizada en la superficie de la región globular, cuando se estructura por sal la proteína), y de esta manera contribuya más eficazmente a la banda de emisión fluorescente de 300 nm.

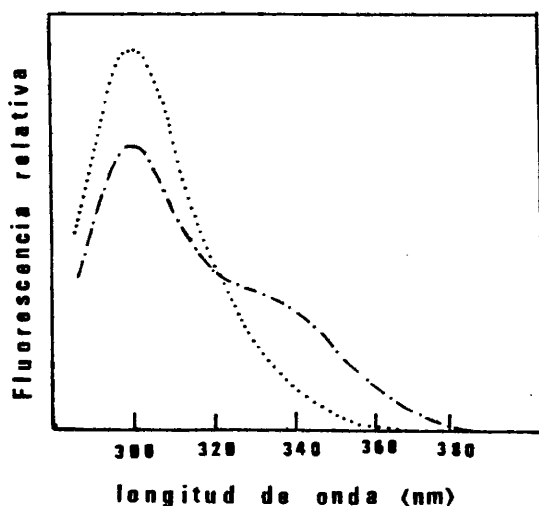


Figura 66. Espectros de emisión de fluorescencia de la histona H1 de *Ceratitidis* (---) NaCl 0.35 M, pH 6.0; (— · —) NaCl 0.35 M-SDS 0.1% (p/v), pH 6.0. La longitud de onda de excitación utilizada fué en ambos casos 275.5 nm.

De nuevo se pone manifiesto que el SDS es un agente capaz de hacer desaparecer las características que diferencian a la tirosina C de insecto (esta vez fluorescentes), confirmando resultados anteriores. Si como se suponía, las peculiaridades del comportamiento estructural de la tirosina C de H1 de insecto están motivadas por un entorno con la presencia de residuos cargados positivamente, es lógico pensar que la adición de SDS, que es capaz de neutralizar cargas positivas e induce una estructura en las histonas diferente a la nativa, por estos dos motivos fundamentalmente, provoque la ausencia de estas diferencias en las transiciones estructurales de este residuo de tirosina.

#### 3.4.3. ESTUDIOS ESTRUCTURALES EN EL PEPTIDO DE MAYOR TAMAÑO MOLECULAR OBTENIDO POR HIDROLISIS CON CNBr DEL PRT DE CERATITIS CAPITATA

Hasta aquí se ha utilizado la influencia que, sobre los entornos que rodean a las tirosinas, tiene la estructuración inducida por sal y SDS, como principal factor en el estudio de la estructura terciaria de las dos histonas (tímo e insecto), aprovechando las diferencias que, en dicroísmo circular y fluorescencia, muestran los dos residuos de tirosina de H1 de *Ceratitis*. Estas diferencias parecen requerir una estructura específica en las moléculas de histona y sus PRTs, capaz de adquirirse en sal pero no en presencia de SDS. Sería, por tanto, interesante poder estudiar comparativamente una región de la molécula que, conteniendo ambas tirosinas, sufriera cambios estructurales diferentes con el aumento de la fuerza iónica. El PG<sub>CNB</sub>-PRT se adapta bastante bien a estos requerimientos. En primer término, es muy semejante al PRT: tan sólo está ausente un fragmento N-terminal de 13 residuos (ver resultados de secuencia), por lo que contiene los dos restos de tirosina; y en segundo lugar, este péptido se estructura de manera diferente con la fuerza iónica que el PRT o H1 intacta, como se describió en el apartado 3.3.4. (figura 42, tabla XVI).

3.4.3.1. DICROISMO CIRCULAR EN LA REGION DEL UV PROXIMO DEL  
PG<sub>CNB</sub>-PRT

Los resultados de la estructuración por sal, hasta 0.35 M en KF, del PG<sub>CNB</sub>-PRT, seguida por dicroismo circular en el UV próximo, se muestran en la figura 67. Con la adición de sal comienza a aumentar la anisotropía óptica de tirosinas. Desde los primeros momentos se aprecia un espectro de elipticidad negativa, con un mínimo alrededor de 273-275 nm, y un pequeño máximo centrado en 287-290 nm aproximadamente. Este pequeño máximo aumenta ligeramente a valores superiores a KF 0.15 M (curva e, figura 67), mientras que la banda de elipticidad negativa aumenta en todo el rango de fuerza iónica ensayado. Esto podría querer decir que la tirosina C, en este péptido, se empieza a estructurar más tarde de lo que ocurría en el caso de PRT y H1 intacta, hecho que estaría de acuerdo con la más lenta adquisición de estructura secundaria ordenada, que se observa en este péptido, con la fuerza iónica (figura 42, tabla XVI). Además, el espectro de dicroismo circular en KF 0.35 M de dicho péptido (curva g, figura 67) se parece cualitativamente mucho más al de H1 y PRT de timo, con el mínimo a 275 nm (frente a 277 nm en H1 de timo y 266 nm en H1 y PRT de *Ceratitidis* en idénticas condiciones, figura 48).

La magnitud de  $[\theta]_{275}$  en KF 0.35 M es 1000 grados  $\times$   $\text{cm}^2 \times (\text{dmol de proteína})^{-1}$  es muy inferior a la alcanzada en ese medio en el espectro de H1 de timo y de insecto. Este dato puede ser reflejo de una parcial estructuración de la molécula de PG<sub>CNB</sub>-PRT en estas condiciones, suficiente para que la anisotropía de las tirosinas dé un espectro de estas características, pero estructuración que no se ha completado aún, como muestran los resultados de estructura secundaria. La tirosina C, por tanto, contribuiría en muy pequeña proporción al espectro de dicroismo circular en esta región, y de ahí el pequeño máximo a 287 nm y el desplazamiento general del espectro de dicroismo circular hacia una mayor semejanza con el de H1 de timo, pues la mayor influencia al mismo estaría a cargo de la tirosina T de *Ceratitidis*, cuyo entorno, además, se estructura antes (figura 67). Otra posible interpretación

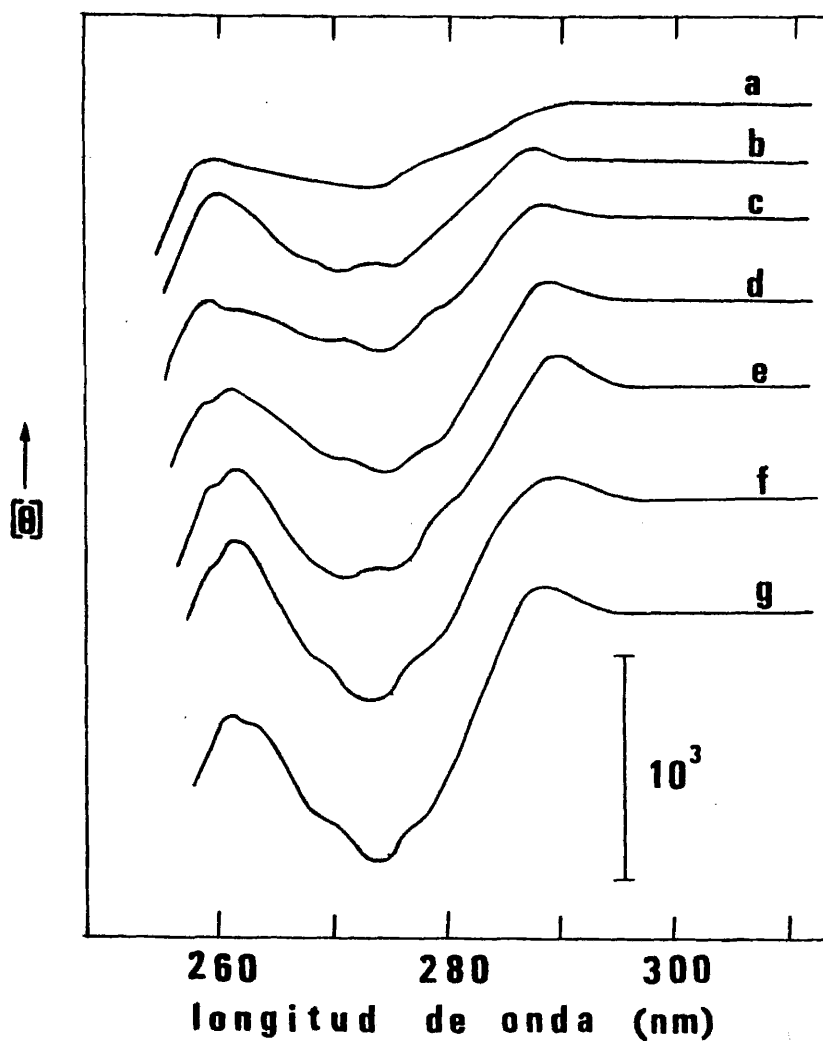


Figura 67. Espectros de dicroísmo circular (UV próximo) del PG<sub>CNB</sub>-PRT a diferentes valores de fuerza iónica. (a) Agua, pH 4.0; (b) KF 0.05 M, pH 6.0; (c) KF 0.1 M, pH 6.0; (d) KF 0.15 M, pH 6.0; (e) KF 0.20 M, pH 6.0; (f) KF 0.25 M, pH 6.0; (g) KF 0.35 M, pH 6.0.



del bajo valor de elipticidad observado, y la no aparición de elipticidad positiva (prácticamente ninguna), sería el menor desplazamiento hacia el rojo de la tirosina C en este péptido. Con lo cual, la suma de la contribución positiva al espectro de la tirosina C y la negativa de la tirosina T daría un espectro de estas características.

Estos resultados hacen pensar que la emisión de fluorescencia de este péptido, que hasta ahora ha sido otra medida de las anomalías que presenta la tirosina C, debe ser muy distinta a la que muestra H1 y PRT de *Ceratitis*, y que esta amortiguación en la estructuración del péptido por sal debe tener cierto reflejo en los datos que se obtengan por esta técnica.

#### 3.4.3.2. FLUORESCENCIA DEL PG<sub>CNB</sub>-PRT

Los estudios de fluorescencia de este fragmento de la molécula, obtenido por hidrólisis con CNBr del PRT de insecto, vienen a corroborar esta suposición anterior.

Los espectros de emisión fluorescente del péptido a pH ácido y KF 0.35 M, pH 6.0 son muy semejantes y no muestran la presencia de banda alguna de emisión fluorescente a 340 nm, siendo cualitativamente semejantes al espectro de H1 y PRT de timo. Si bien, es interesante comentar que el espectro de emisión de fluorescencia en presencia de sal muestra una caída más suave (figura 68).

Esto está de acuerdo con el dicroísmo circular (UV próximo) de dicho péptido, en el que como ya se ha comentado, a concentraciones salinas de KF 0.35 M, o bien no tiene apenas contribución la tirosina C, o bien su contribución no está desplazada hacia el rojo. En cualquiera de los casos, la fluorescencia es coherente con la hipótesis de que el residuo de tirosina C debe encontrarse en un entorno diferente al que se encuentra en H1 y PRT, cuando las moléculas se estructuran por sal.

Puesto que en el caso de este péptido las transiciones estructurales tienen lugar entre KF 0.0 M y 1.1 M, pudiera ocu

rrir que en el estado final de la estructuración ( $\geq$  KF 1.1 M, pH 6.0), en el cual posee una estructura secundaria muy similar al PRT (ver apartado 3.3.4.), sí se observaran estas características específicas de la tirosina C, y la caída más suave del espectro de emisión fluorescente y el ligero aumento de la elipticidad positiva del espectro de dicroísmo circular fueran indicio de ellas. Sin embargo, lo que sí parece bastante claro, a la vista de estos resultados, es la importancia del fragmento N-terminal que se le ha quitado al PRT por hidrólisis con CNBr y la necesidad de la integridad total del PRT para la adquisición de una estructura específica en determinadas condiciones salinas.

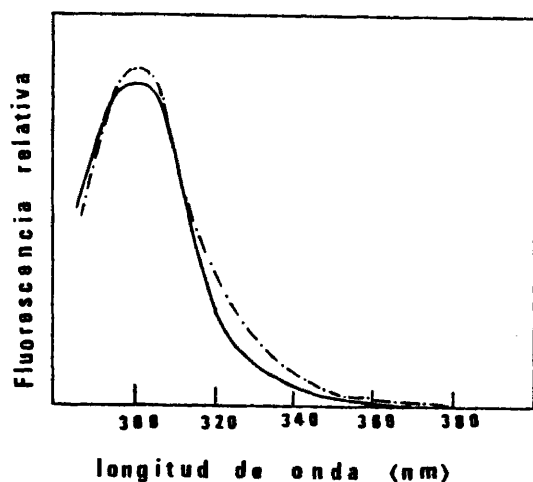


Figura 68. Espectros de emisión fluorescente del  $\text{PG}_{\text{CNB}}\text{-PRT}$ . (—) Agua, pH ácido; (---) KF 0.35 M, pH 6.0. La longitud de onda de excitación utilizada fué en ambos casos 275.5 nm.

Cuando se realizó una digestión controlada con tripsina del  $\text{PG}_{\text{CNB}}\text{-PRT}$ , en idénticas condiciones que las descritas en el apartado 2.5.1., y en la que se obtenía el PRT, se observó que la resistencia a la acción de la proteasa de este péptido es mucho menor que la observada en el caso del PRT; este dato sirve de prueba indirecta y está de acuerdo con una diferente estructuración del  $\text{PG}_{\text{CNB}}\text{-PRT}$  por sal, ya que la digestión triptica se llevó a ca

bo en NaCl 1.0 M- Fosfato 50 mM, pH 8.0, condiciones suficientes para que el  $PG_{CNB}$ -PRT se encuentre en su máximo grado de estructuración, y al menos en él, los residuos básicos de lisina y arginina se encuentran más accesibles al ataque de la tripsina.

#### 3.4.4. INFLUENCIA DE LA MODIFICACION COVALENTE

Cuando se analizan los datos obtenidos en la modificación por nitración de las histonas H1 de timo e insecto y sus PRTs, existen dos hechos importantes desde el punto de vista estructural. Los PRTs se nitrán con mayor facilidad que sus respectivas moléculas intactas en iguales condiciones y, por otra parte, éstos adquieren menor estructura secundaria por aumento de la fuerza iónica que cuando no se encuentran modificados. Estos resultados parecen interesantes y para poder sugerir una hipótesis, capaz de dar una explicación coherente, fué necesario llevar a cabo una ampliación del estudio estructural de las proteínas modificadas.

##### 3.4.4.1. TITULACION DEL RESIDUO DE TIROSINA NO MODIFICADO EN H1 DE CERATITIS CAPITATA

El primer problema que es preciso resolver, para poder llevar a cabo una discusión estructural sobre las proteínas modificadas, es determinar si existe una modificación específica de uno de los dos residuos de tirosina de H1 de insecto, y en ese caso, de cual de ellos se trata. Con este fin se realizó la titulación de la posible tirosina no modificada cuando la proteína se nitró en condiciones en las que los cálculos revelaron la presencia de 1.2 residuos de nitrotirosina.

Puesto que el  $pK'_a$  de los residuos de 3-nitro-L-tirosina se encuentran muy por debajo del  $pK'_a$  de la tirosina sin modificar, hacia pH 7.0 aproximadamente y según el entorno (Sokolovsky et al., 1967), y como los valores de  $pK'_a$  de los residuos de tirosina de H1 de insecto difieren bastante entre sí (tabla XVII), se puede esclarecer cual de los dos residuos, tirosina C ó T, ha sufrido la

modificación.

La titulación se siguió mediante espectroscopía de diferencia, midiendo el  $\Delta A_{295}$  con la variación del pH. Un procedimiento similar se empleó en el estudio de la accesibilidad al tetranitrometano de los residuos de tirosina de la ribonucleasa (Beaven y Gratzer, 1968). La titulación se comenzó con la proteína previamente estructurada por sal, para evitar los efectos debidos a la estructuración, y a pH 8.0, ya que a este pH la nitrotirosina se encuentra totalmente ionizada y contribuye únicamente al espectro de absorción pero prácticamente no lo hace al espectro de diferencia.

El  $pK'_a$  obtenido de esta forma para el residuo de tirosina no modificado en la histona H1 de insecto resultó ser 11.2 (figura 69), valor que coincide con el obtenido para la tirosina T de *Ceratitis capitata*.

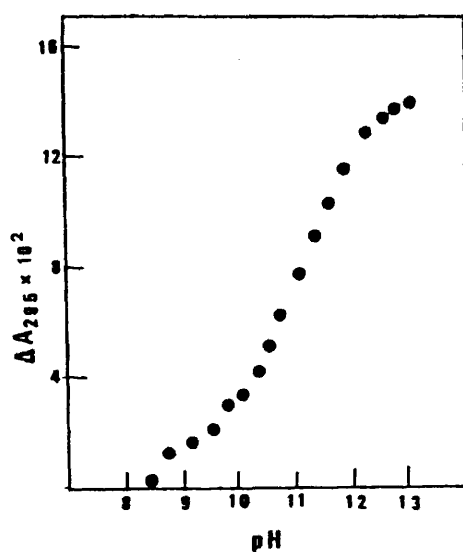


Figura 69. Variación del  $\Delta A_{295}$  con el pH para la histona H1 de insecto no modificada por nitración (1.2 residuos de nitrotirosina).

Este resultado indica que, cuando la molécula de histo

na se encuentra estructurada por sal (condiciones en las que se realizó la nitración), el residuo de tirosina más reactivo con el tetranitrometano es la tirosina C, siendo ésta una confirmación adicional de su localización externa cuando la proteína se estructura. La tirosina T, situada hacia el interior de la región globular, es más inaccesible al agente y por ello se encuentra muy poco o casi nada nitrada. Esto quiere decir que el pico NBS-2, obtenido de la hidrólisis con NBS de la histona H1 de insecto, corresponde al producto de rotura por la tirosina C, ya que, cuando la molécula se nitra, este pico deja de ser mayoritario (ver apartado 3.1.4.).

El residuo de tirosina 72 de H1 de timo, por tanto, se nitra muy poco en idénticas condiciones, debido fundamentalmente a su localización interna cuando la molécula se pliega. Estos resultados vuelven a confirmar una similitud en el entorno y comportamiento de la tirosina T de insecto y la tirosina de timo.

#### 3.4.4.2. INFLUENCIA DE LA NITRACION SOBRE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

Aunque este estudio ya se ha comentado en el apartado 3.3.3., en el que se discutieron los correspondientes espectros de dicroísmo circular (UV lejano) de las proteínas modificadas, una segunda parte de estos resultados ofrece información sobre la estructura tridimensional de las proteínas y sus PRTs en solución y por ello se ha preferido discutirlo en este apartado, teniendo ya datos concretos sobre la especificidad de la modificación.

La nitración de los PRTs lleva consigo una pérdida de estructura helicoidal, incluso en aquellas condiciones en que solamente se nitrán 1.3 residuos de tirosina. Sin embargo, la nitración de 1.2 tirosinas en la histona H1 intacta no parecía afectar al porcentaje de esta estructura (tabla XV). Cuando las cinéticas de nitración de H1 y PRT se siguieron por medida del  $\Delta [\theta]_{222}$  según aumentaba el tiempo de reacción, se obtuvieron resultados que confirmaban estos anteriores.

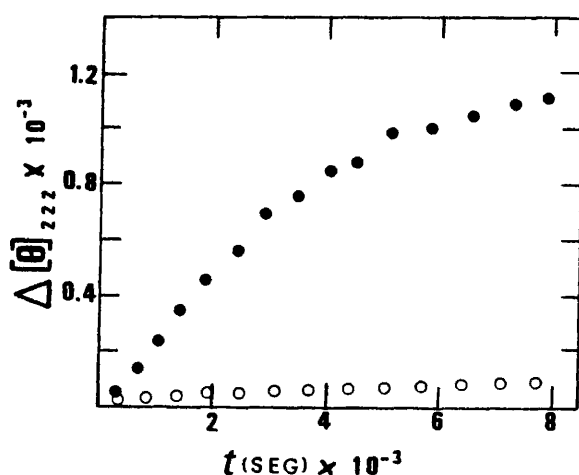


Figura 70. Variación de la elipticidad a 222 nm con el tiempo de nitración. (○) H1 de *Ceratitidis capitata* ; (●) PRT de *Ceratitidis capitata* . La nitración se llevó a cabo en ambos casos en condiciones estructurantes (NaCl 1.0 M-fosfato 50 mM, pH 8.0).

Como se muestra en la figura 70, la nitración progresiva del PRT lleva consigo una pérdida paulatina de estructura helicoidal, que se pone de manifiesto por un aumento de la elipticidad a 222 nm. Por el contrario, la nitración afecta muy poco a la medida de  $[\theta]_{222}$  de la histona H1 de insecto. Este resultado puede significar que la nitración de uno de los residuos de tirosina, el externo por los resultados de titulación, afecta a la estructura de la región globular aislada en solución, pero no a la de la misma región incluida en el total de la molécula de histona. Pero también cabe otra posible explicación: que en el caso de H1 intacta se nitre muy específicamente la tirosina externa y en el caso del PRT se nitre, aunque mejor esta misma, a la vez la interna, de forma que el porcentaje de nitración obtenido (1.3 residuos de nitrotirosina) en el PRT posea una mayor contribución de nitrotiro

sina interna que en el caso de H1 modificada. Esta segunda hipótesis supondría exclusivamente que la región globular aislada posea una conformación menos compacta que cuando está formando parte del total de la molécula, de forma que la tirosina T se encuentra más accesible al reactivo. Mientras que la primera hipótesis es menos probable, a la vista de los resultados obtenidos por dicroísmo circular, la segunda hipótesis parece más probable y sería, además, capaz de justificar el mayor porcentaje de nitración observado en los PRTs de timo e insecto. Asimismo estaría de acuerdo con el mayor quenching de fluorescencia observado para la tirosina 72 de timo en el PRT que en la histona sin digerir (apartado 3.4.1.4.). Además, en timo sólo existe un residuo de tirosina, por lo que la primera hipótesis, en este caso, no tendría validez.

#### 3.4.4.3. DICROISMO CIRCULAR EN EL UV PROXIMO DE LAS HISTONAS Y SUS PRTs MODIFICADOS

El dicroísmo circular en la región del UV próximo de las moléculas nitradas tiene una gran importancia, ya que aporta datos que pueden ayudar a confirmar las interpretaciones sugeridas en apartados anteriores.

Este estudio se realizó con las histonas H1 y sus PRTs nitrados a diferentes tiempos en condiciones estructurantes. La figura 71 muestra los resultados obtenidos con esta técnica en la histona H1 de timo y su PRT nitrados 100 minutos.

El cambio observado en el espectro de dicroísmo circular de H1 de timo modificada cuando se adiciona sal resulta difícil de interpretar, ya que puede ser debido a la composición de espectros de tirosina y nitrotirosina, puesto que la histona nitrada en estas condiciones presenta aproximadamente 0.5-0.6 residuos de nitrotirosina. El PRT de timo de ternera, nitrado en idénticas condiciones (0.8-0.9 residuos de nitrotirosina), sí posee, en cambio, un espectro de dicroísmo circular, en la región del UV próximo, significativo (figura 71). En la figura se observa un espectro con elipticidad positiva cuyo máximo está centrado en 280 nm, correspondiente al péptido modificado y realizado en agua a pH ácido. La

adición de KF hasta 0.4 M produce muy pocos o ningún cambio en este espectro. Es decir, el residuo de nitrotirosina posee anisotropía óptica, incluso cuando el PRT se encuentra muy poco estructurado en agua a pH ácido. La pequeña estructuración posterior, por adición de KF 0.4 M, no tiene apenas efecto sobre la contribución de este residuo de nitrotirosina al dicroísmo circular.

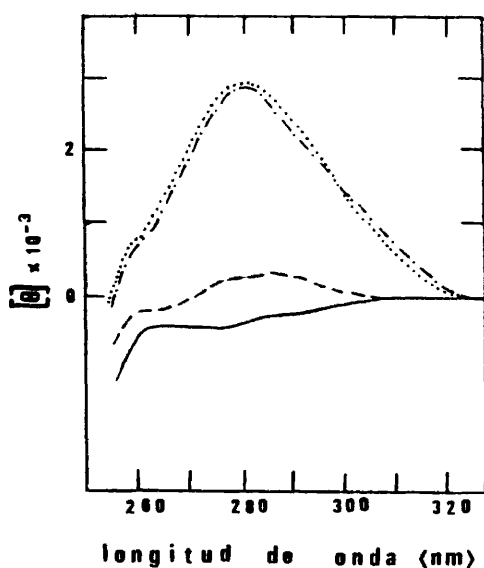


Figura 71. Espectros de dicroísmo circular de la histona H1 de timo mo modificada; (—) agua, pH 3.0; (---) KF 0.4 M, pH 6.0; y de PRT de timo mo modificada; (-·-) agua, pH 3.0; (····) KF 0.4 M, pH 6.0.

En el caso de la histona de *Ceratitidis* los resultados presentan importantes diferencias. La histona nitrada en condiciones suaves (1.2 residuos de nitrotirosina) presenta un espectro de dicroísmo circular en esta región con elipticidad positiva, incluso en agua a pH ácido. Este espectro aumenta de elipticidad y su máximo se desplaza hacia el rojo como consecuencia de la adición de sal (figura 72). Cuando se realizaron estos estudios con la histona de insecto nitrada en condiciones más enérgicas (1.7 residuos de nitrotirosina), no se observó desplazamiento alguno del máximo y las magnitudes de  $[\theta]_{285}$  eran claramente superiores al caso anterior, como consecuencia de un mayor porcentaje de mo



dificación. La presencia de diferentes contribuciones al espectro de dicroísmo circular en el UV próximo de nitrotirosina C, nitrotirosina T y tirosina T sin modificar hacen muy difícil cualquier discusión sobre los desplazamientos y cambios observados en el espectro al adicionar sal.

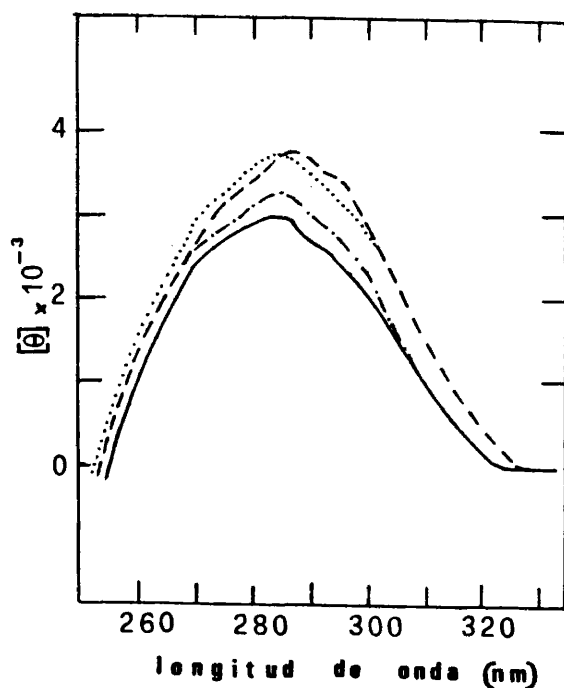


Figura 72. Espectros de dicroísmo circular de la histona H1 de *Ceratitis* modificada en diferentes condiciones; (—) agua, pH 3.0; (---) KF 0.4 M, pH 6.0, en estos dos casos la histona utilizada presenta 1.2 nitrotirosinas. (—) Agua, pH 3.0; (.....) KF 0.4 M, pH 6.0, en estos dos últimos la histona presenta 1.7 residuos de nitrotirosina.

Sin embargo, estos resultados confirman una nitración más intensa en la histona de insecto que en su homóloga de timo, debido a la presencia del residuo de tirosina C más accesible al tetranitrometano.

Los resultados obtenidos con el PRT de insecto y que

se muestran en la figura 73, se inclinan en el mismo sentido, pero con un dato claramente diferente. La magnitud de la elipticidad en el máximo, en todos los casos, es mayor que la que se alcanzaba, en idénticas condiciones, con las moléculas sin digerir. Este resultado está de acuerdo con un mayor porcentaje de nitración en el PRT que la H1 intacta. Asimismo, las diferentes contribuciones al espectro de las distintas especies moleculares hace muy difícil la interpretación de los cambios del espectro al estructurarse la molécula por sal.

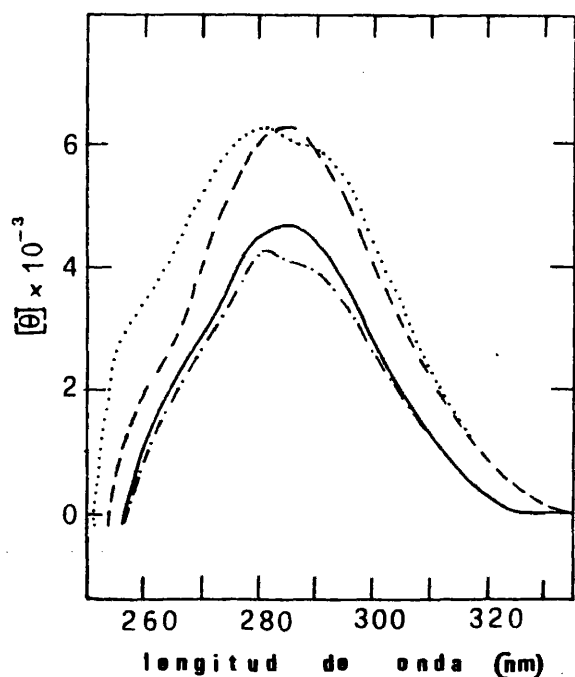


Figura 73. Espectros de dicroísmo circular del PRT de insecto mo modificado en condiciones suaves (1.3 residuos de nitrotirosina), (—) agua, pH 4.5; (---) KF 0.4 M, pH 6.0; y mo modificado en condiciones enérgicas (1.9 residuos de nitrotirosina), (-.-) agua, pH 4.5; (....) KF 0.4 M, pH 6.0.

Los estudios sobre las histonas y sus PRTs modificados, aunque en muchas ocasiones difíciles de interpretar, han contribuido a sustentar la hipótesis que ya se apuntaba en resultados anteriores (fluorescencia del PRT de timo), según la cual la región globular aislada, que está contenida en el PRT de cada histona, posee

una estructura diferente a la que presenta este mismo dominio incluido en la molécula de histona. Estas diferencias estructurales no deben ser muy grandes, a juzgar por los resultados de dicroísmo circular (UV próximo) comentados en el apartado 3.4.1.2., pero sí que poseen la suficiente importancia como para tenerlas presentes a la hora de extrapolar resultados que se hayan obtenido con los PRTs.

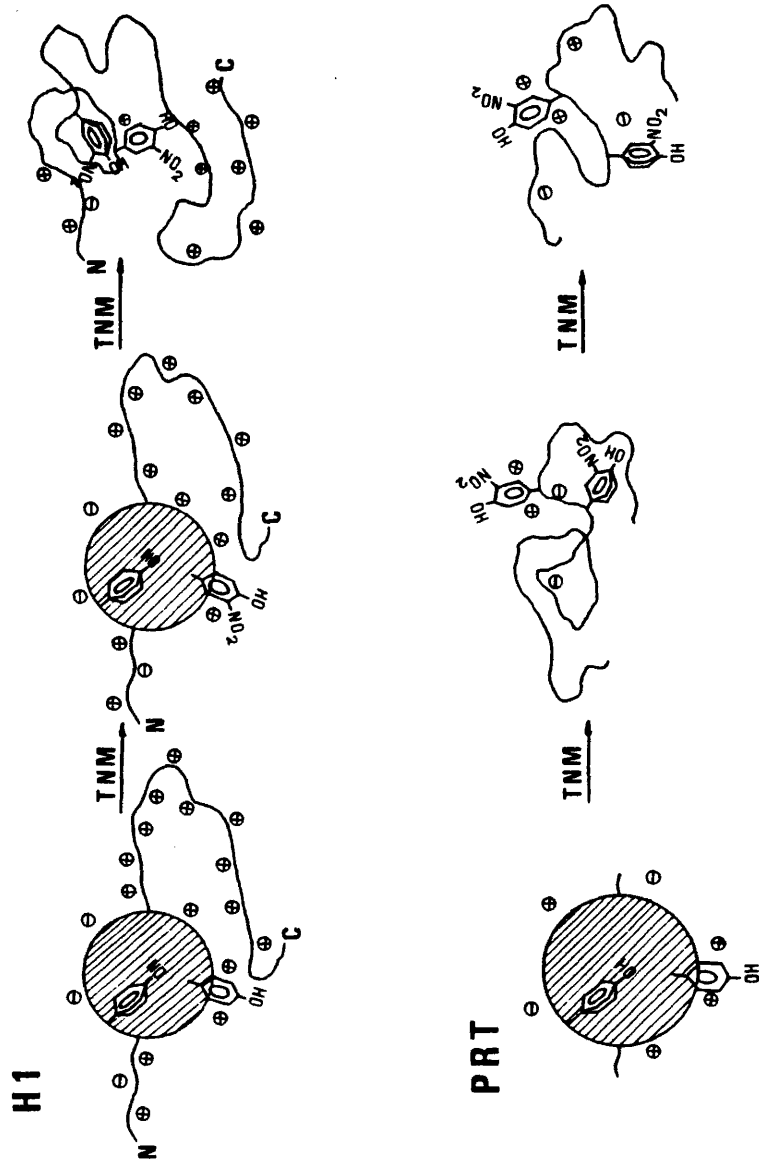
### 3.5. MODELO PROPUESTO PARA LA DINAMICA ESTRUCTURAL DE LA HISTONA H1 DE CERATITIS CAPITATA Y SU REGION GLOBULAR RESISTENTE A LA TRIPSINA

Los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas utilizadas permiten proponer un modelo sobre la dinámica estructural de la histona H1 de insecto y su PRT, como consecuencia del aumento de fuerza iónica.

La diferencia entre H1 intacta y región globular resistente a la tripsina, basada fundamentalmente en la distinta reactividad con tetranitrometano que presenta en ambas el residuo de tirosina interno, puede traducirse únicamente en una menor compactación de la estructura general de esta región hidrofóbica (PRT) aislada. La desaparición de las regiones N y C-terminales, muy polares, de la histona, en el proceso de digestión con tripsina, llevaría consigo una expansión de la región globular (círculo de mayor tamaño en el modelo de la figura 74), probablemente por la pérdida de interacciones iónicas entre los residuos cargados, externos, de la región globular, y de las zonas N y C-terminales. De esta forma, mientras que en H1 intacta el tetranitrometano modifica fundamentalmente el residuo de tirosina C, más accesible, en el PRT, desde los primeros momentos de la reacción, existe ya modificación del residuo de tirosina T (figura 74).

Aparte de esta diferencia, las transiciones estructurales de H1 y PRT inducidas por el pH y la fuerza iónica parecen ser en general muy semejantes. A concentraciones de aproximadamente 0.08-0.1 M en KF, el entorno de la tirosina T está ya en un grado

Figura 74



avanzado del proceso de estructuración (rayado en el modelo), mientras que el entorno de la tirosina C comienza a estructurarse a valores superiores de concentración salina. En el estado final del proceso, el cual se consigue en KF 0.3 M en ambos, la tirosina T se encuentra orientada hacia el interior de la región globular, de forma similar a lo que ocurre en el caso de la tirosina 72 en H1 de timo. Por el contrario, la tirosina C parece estar localizada en la superficie de la molécula, en un entorno cargado positivamente y orientada hacia el medio polar.

En el caso del PG<sub>CNB</sub>-PRT este péptido sufre una estructuración más "ralentizada", necesitándose valores muy superiores de concentraciones salinas para completar el proceso. En éste la localización de la tirosina C, en el estado final, es más incierta y no se puede adjudicar de una manera tan precisa a la vista de los resultados obtenidos. Por eso, el modelo propone las dos alternativas: a) Una situación análoga a la que posee cuando H1 y PRT se estructuran y b) de forma semejante a la tirosina T, hacia el interior, rodeada de restos hidrofóbicos. En cualquiera de los dos casos, lo que sí queda claro es que este péptido posee una estructura diferente que permite el ataque rápido de la tripsina hacia alguno de los residuos básicos de lisina y/o arginina (figura 75).

H1

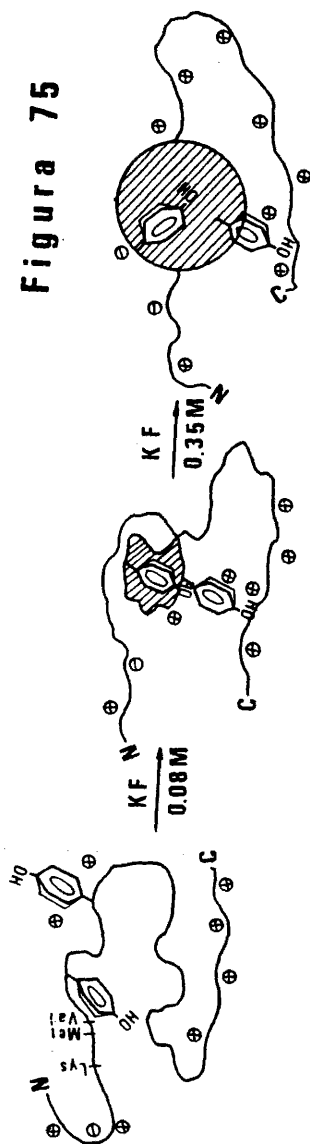
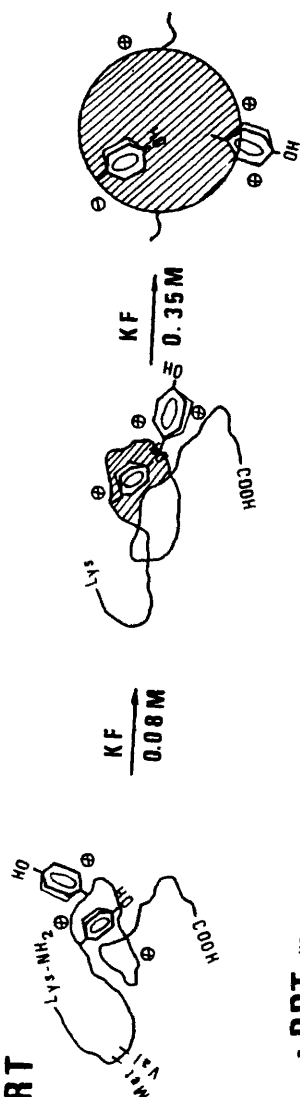
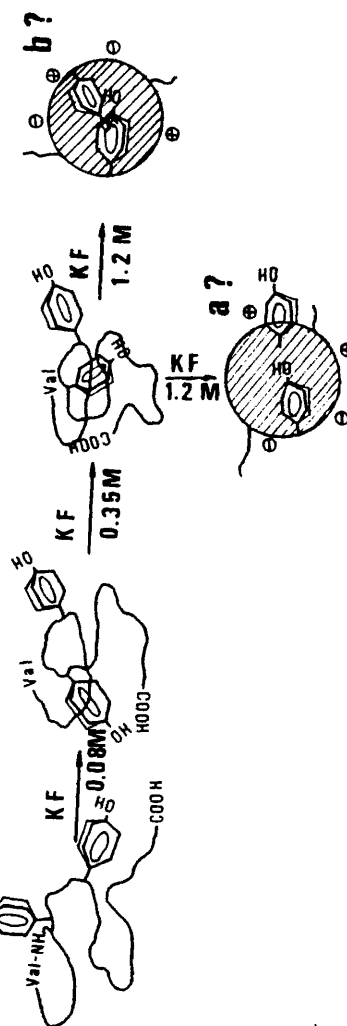


Figura 75

PRT



PG<sub>CNB</sub>-PRT



166

#### **4.CONCLUSIONES**

El objeto del presente trabajo ha sido la obtención de nuevos datos sobre la estructura de las histonas H1, debido, fundamentalmente, al importante papel que parecen desempeñar estas histonas en la estructura de la cromatina. A lo largo de las investigaciones reseñadas en esta memoria se han obtenido las siguientes conclusiones:

- La histona H1 de *Ceratitidis capitata* posee una composición de aminoácidos muy semejante a la de la histona H1 de *Drosophila melanogaster*, así como una distribución muy similar de los residuos característicos.
- La reactividad de los residuos de tirosina de la histona H1 de *Ceratitidis capitata* con NBS parece ser distinta, mostrando el agente una especificidad muy alta por uno de ellos.
- A diferencia con la histona H1 de timo de ternera, la histona H1 de *Ceratitidis* posee más de un sitio de rotura preferencial por trombina.
- La secuencia del fragmento de 27 residuos obtenida de la región N-terminal del PRT de la histona de *Ceratitidis capitata* tiene mayor homología con zonas idénticas de las histonas H1 de embrión de erizo de mar (P.M.) y de esperma de erizo de mar (P.A.). Esta relación estructural debe convertirse en una mayor proximidad funcional.
- La presencia de aminoácidos muy conservados en todas las histonas de secuencia conocida (Pro5, Lys19, Arg21 y Gly23, numeración en timo de ternera) se observa asimismo en la región N-terminal del PRT de insecto. Esto revela la necesidad de ciertos residuos en regiones concretas para la estructura específica de este dominio central de las histonas muy ricas en lisina.
- El comportamiento estructural con el pH y la fuerza iónica es muy similar en ambas histonas H1 (timo e insecto).
- La estructuración por sal de las moléculas de histona no es un proceso cooperativo, mientras que las transiciones estructurales inducidas por el aumento de pH sí lo son. Este hecho puede explicar



se por las diferencias fundamentales que existen entre ambos tratamientos; mientras que el aumento de fuerza iónica principalmente apantalla cargas y favorece las interacciones hidrofóbicas, el aumento de pH se traduce, en muchos casos, en un plegamiento cooperativo de las proteínas favorecido por la titulación de los residuos básicos de lisina y arginina.

- Se han aislado las regiones resistentes a la digestión triptica, en condiciones estructurantes, de ambas histonas y se ha demostrado que estos péptidos resistentes contienen el total de la región capaz de adquirir estructura ordenada de las moléculas respectivas. Probablemente, el PRT de timo es idéntico al fragmento denominado "Tr-Tr", aislado por Hartman et al. (1977).
- Estos PRTs presentan variaciones estructurales, con el aumento de pH y fuerza iónica, muy similares entre si y semejantes a los observados y ya comentados en las moléculas intactas de las que proceden. Resultado lógico, por otra parte, para las regiones que contienen toda la estructura helicoidal de las moléculas paternas.
- Los estudios en presencia de un detergente, SDS, confirman estas similitudes observadas. El tratamiento con este agente induce un elevado porcentaje de  $\alpha$ -hélice en la estructura de ambas histonas.
- La histona de insecto contiene dos residuos de tirosina en su molécula (a diferencia de la histona de timo e igual que la histona H1 de esperma de erizo de mar), que están localizados en la región estructurable de la molécula, es decir presentes en el PRT.
- Uno de los residuos de tirosina de H1 de insecto, denominado tirosina T, se comporta en sus transiciones estructurales de forma análoga a la tirosina 72 de H1 de timo y se encuentra localizada hacia el interior de la región globular, en un entorno hidrofóbico, en el estado final de la estructuración por sal.
- Este residuo interno de tirosina de la histona de *Ceratitis* se comienza a estructurar en los inicios de la adición salina, su  $pK'_a$  es idéntico al de la tirosina de timo, y al igual que en ésta, no varía con la fuerza iónica.
- El residuo de tirosina extra de la histona de insecto, denominado

tirosina C, posee características marcadamente diferentes; su  $pK'_a$  es anormalmente bajo y muy dependiente de la fuerza iónica, como corresponde a residuos de tirosina situados hacia el medio polar en la superficie de proteínas.

- Este residuo externo se estructura en una segunda etapa del proceso de plegamiento de la histona, después de que lo haya hecho la tirosina T, que en este momento se encuentra ya en un grado muy avanzado de su estructuración.
- El espectro de absorción, dicroísmo circular en el UV próximo y emisión de fluorescencia están anormalmente desplazados hacia el rojo en el caso de la tirosina C cuando la molécula se encuentra estructurada. Debido a su localización externa este hecho debe ser, más bien, causa de grupos cargados en su proximidad, que de una transición hacia un entorno más apolar.
- Estos desplazamientos anómalos observados en la tirosina C de insecto desaparecen por completo cuando la histona o su PRT se encuentran en presencia de SDS. El  $pK'_a$  de ambas tirosinas, en estas condiciones, es idéntico e igual a 12.2, reflejo de un entorno similar y muy hidrofóbico para ambos residuos.
- La nitración de la histona H1 de insecto en condiciones tales que la molécula se encuentra estructurada modifica preferentemente el residuo de tirosina externo, más expuesto al agente, no mostrando pérdida alguna de estructura secundaria en la molécula de histona durante un largo período de la reacción.
- El residuo de tirosina T, interno, de la H1 de insecto, similar al de la histona de timo, se nitra más lentamente y en condiciones más enérgicas. La modificación de este residuo sí implica una pérdida de estructura secundaria, reflejo de un papel más importante en la estructuración de la región globular de la molécula.
- La estructuración del dominio globular de estas proteínas, como consecuencia del aumento de fuerza iónica, debe tener algunas diferencias cuando se comparan las moléculas intactas con sus respectivos PRTs, ya que existe una mayor accesibilidad del reactivo de nitración al residuo de tirosina interno en éstos últimos que en las histonas sin digerir.

- En H1 de insecto parecen existir por tanto tres dominios estructurales semejantes a los encontrados en H1 de mamíferos. Aunque se ha postulado que el dominio central es básico en las interacciones proteína-proteína y los dominios N y C-terminales importantes en las interacciones proteína-DNA, no existe una absoluta independencia entre ambos, de forma que las regiones N y C-terminales, muy polares, pueden modular la conformación precisa del dominio globular, al menos con la histona en solución.
- El mantenimiento de la estructura íntegra del PRT de la histona H1 de *Ceratitidis* es fundamental para la adquisición de la estructura nativa de esta región. La pérdida de un fragmento N-terminal de 13 residuos supone una amortiguación muy drástica en la estructuración del fragmento restante, necesitándose valores de fuerza iónica muy elevados para llegar a conseguir en este péptido resultante una estructura secundaria similar a la del PRT del que procede.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Alfageme, C.R., Zweidler, A., Mahowald, A. y Cohen, L.H. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3729.
- Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C. y Avilés, F.J. (1980) Nature 288, 675.
- Avilés, F.J., Chapman, G.E., Kneale, G.G., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 363.
- Avilés, F.J., Danby, S.E., Chapman, G.E., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1979) Biochim. Biophys. Acta 578, 290.
- Axel, R. (1975) Biochemistry 14, 2921.
- Bakayev, V.V., Bakayeva, T.G. y Varsharsky, A.J. (1977) Cell 11, 619.
- Barbero, J.L. (1978) Tesina de Licenciatura.
- Beaven, G.H. y Gratzer, W.B. (1968) Biochim. Biophys. Acta 168, 456.
- Bonner, W.M. y Stedman, J.D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2190.
- Boublick, M., Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C. y Rattle, H.W.E. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 258.
- Boulikas, T. Wiseman, J.M. y Garrard, W.T. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 127.
- Bradbury, E.M., Carpenter, B.G. y Rattle, H.W.E. (1973) Nature 241, 123.
- Bradbury, E.M., Cary, P.D., Champagne, G.E., Crane-Robinson, C., Danby, S.E., Rattle, H.W.E. Boublick, M., Palau, J. y Avilés, J.F. (1975a) Eur. J. Biochem. 52, 605.
- Bradbury, E.M., Champagne, G.E., Danby, S.E., Hartman, P.G. y Riches, P.L. (1975b) Eur. J. Biochem. 57, 521.
- Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Goodman, H. Rattle, H.W.E. y Stephens, R.M. (1967) J. Mol. Biol. 29, 507.
- Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Phillips, D.M.P., Johns, E.W. y Murray, K. (1965) Nature 205, 1315.

- Bram, S. y Ris, H. (1971) J. Mol. Biol. 55, 325.
- Briand, G., Knieczik, D., Sautiere, P. Wouters, D., Borie-Loy, O., Biserte, G., Mazen, A. y Champagne, M. (1980) FEBS Letters 112, 147.
- Britton, R.G. y Kohne, D.E. (1968) Science 161, 529.
- Bustin, M. (1971) Biochim. Biophys. Acta 251, 172.
- Bustin, M. y Cole, R.D. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5291.
- Chalkley, R. y Hunter, C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1304.
- Champagne, M. y Mazen, A. (1967) C.R. Acad. Sci. Paris 265, 2100.
- Champagne, M., Mazen, A. y Wilhelm, X. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1261.
- Chapman, G.E., Avilés, F.J., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1978b) Eur. J. Biochem. 90, 287.
- Chapman, G.E., Hartman, P.G. y Bradbury, E.M. (1976) Eur. J. Biochem. 61, 69.
- Chapman, G.E., Hartman, P.G., Cary, P.D., Bradbury, E.M. y Lee, D.R. (1978a) Eur. J. Biochem. 86, 35.
- Chen, Y.H., Yang, J.J. y Martinez, H.M. (1972) Biochemistry 11, 4120.
- Christen, P. y Riordan, J.F. (1968) Biochemistry 7, 1531.
- Christen, P., Vallee, B.L. y Simpson, R.T. (1971) Biochemistry 10, 1377.
- Christiansen, G. y Griffith, J. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 1837.
- Cole, R.D. (1977) en The Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus (Ts'o, P.O.P., Ed.) Vol. I, pag. 93-104 Amsterdam.
- Cowman, M.K. y Fasman, G.D. (1980) Biochemistry 19, 532.
- Crane-Robinson, C., Danby, S.E., Bradbury, E.M., Garel, A., Kovacs, A.M., Champagne, M. y Daune, M. (1976) Eur. J. Biochem. 67, 379.
- Craven, G.R., Steers, E. y Anfinsen, C.B. (1965) J. Biol. Chem. 240, 2468.

- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1974) *Biochemistry* 13, 4992.
- Davidson, E.H. y Britton, R.J. (1973a) *Q. Rev. Biology* 48, 565.
- Davidson, E.H., Hought, B.R., Amenson, C.S. y Britton, R.J. (1973b) *J. Mol. Biol.* 77, 1.
- DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. y Bonner, J. (1969) *J. biol. Chem.* 244, 319.
- DeLange, R.J., Hooper, J.A. y Smith, E.L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 882.
- Dick, C. y Johns, E.W. (1969) *Comp. Biochem. Physiol.* 31, 529.
- Donovan, J.W. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1961.
- Edwards, P.A. y Shooter, K.V. (1969) *Biochem. J.* 114, 227.
- Felsenfeld, G. (1978) *Nature* 271, 115.
- Finch, J.T. y Klug, A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1897.
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushiton, B., Levitt, M. y Klug, A. (1977) *Nature* 269, 29.
- Franco, L., Montero, F., Navlet, J.M., Perera, J. y Rojo, M.C. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 53.
- Franco, L., Montero, F. y Rodriguez-Molina, J.J. (1977) *FEBS Letters* 78, 317.
- Garel, A. y Axel, R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3966.
- Garel, A., Mazen, A., Champagne, M., Sautiere, P., Kniecik, D., Loy, O. y Biserte, G. (1975) *FEBS Letters* 50, 195.
- Gaubatz, J., Hardison, R., Murphy, J., Eichner, M.E. y Chalkley, R. (1977) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 265.
- Glazer, A.N., DeLange, R.T. y Sigman, D.S. (1975) en *Chemical Modification of Proteins (T.S. Work y E. Work, Ed.)* pag. 98. North-Holland.
- Goodwin, G.H., Nicolas, R.H. y Johns, E.W. (1977) *Biochem.* 167, 485.
- Griffit, J.D. (1975) *Science* 187, 1202.
- Guillot, J.G., Pezolet, M. y Pallotta, D. (1977) *Biochim. Biophys.*

Acta 491, 423.

- Hartman, P.G., Chapman, G.E., Moss, T. y Bradbury, E.M. (1977) Eur. J. Biochem. 77, 45.
- Hayashi, K., Hofstaele, T. y Yakuwa, N. (1978) Biochemistry 167, 1880.
- Henson, P. y Walker, I.O. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 345.
- Henson, P. y Walker, I.O. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 1.
- Hewish, D.R. y Burgoyne, L.A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 504.
- Hjelm, R.P., Kneale, G.G., Suau, P., Baldwin, J.P. y Bradbury, E.M. (1977) Cell 10, 139.
- Hnilica, L. (1967) Prog. Nucleic Acids Res. and Molec. Biol. 7, 5.
- Hozier, J., Renz, M. y Nehls, P. (1977) Chromosoma 62, 301.
- Hurley, C.K. y Stout, J.T. (1980) Biochemistry 19, 410.
- Isenberg, I. (1976) en Search and Discovery, un volumen dedicado a Albert Szent-Gyorgy (Kaminer, B., Ed.) Academic Press, New York.
- Isenberg, I. (1979) Annu. Rev. Biochem. 48, 159.
- Iwai, K. y Ishikawa, H. (1970) Nature 226, 1056.
- Iwai, K., Hayashi, H. y Ishikawa, K. (1972) J. Biochem. 72, 357.
- Jirgensons, B. y Hnilica, L.S. (1965) Biochim. Biophys. Acta 109, 241.
- Johns, E.W. y Butler, J.A. (1962) Biochem. J. 82, 15.
- Johns, E.W. (1964) Biochem. J. 92, 55.
- Johns, E.W. (1967) Biochem. J. 104, 78.
- Jones, G.M.T., Rall, S.C. y Cole, R.D. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2548.
- Kornberg, R.D. (1974) Science 184, 868.
- Kornberg, R.D. y Thomas, J.O. (1974) Science 184, 865.



- Laemmli, V.K. (1970) Nature 227, 680.
- Langmore, Y. y Wooley, J. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2691.
- Lawrence, J.J., Berne, L., Ouvrier-Buffet, J.L. y Piette, L. (1980) Eur. J. Biochem. 107, 263.
- Lewis, P.N. y Bradbury, E.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 336, 153.
- Lewis, E.A., De Buysere, M.S. y Ress, A.W. (1976) Biochemistry 15, 186.
- Littau, V.C., Burdick, C.J., Allfrey, V.G. y Mirsky, A.E. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1204.
- Lohr, D., Conden, J., Tachell, K., Kovacic, R. y Van Holde, K.E. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 79.
- Lutter, L.C. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 41.
- Luzzati, V. y Nicolaieff, A. (1963) J. Mol. Biol. 7, 142.
- Marion, C. y Roux, B. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 535.
- McCleary, A.R. y Fasman, G. (1980) Archives of Biochem. Biophys. 201, 603.
- McLeod, A.R., Wong, N.C.W. y Dixon, G.H. (1977) Eur. J. Biochem. 78, 281.
- Mendez, E. y Lai, C. Y. (1975) Anal. Biochem. 68, 47.
- Morris, N.R. (1976) Cell 9, 627.
- Municio, A.M., Odriozola, J.M. y Piñeiro, A. (1970) Comp. Biochem. Physiol. 37, 387.
- Murray, K. (1964) en The Nucleohistones (Bonner, J. y Ts'o, Ed.), pag. 15. San Francisco, London, Amsterdam.
- Murray, K., Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Stephens, R.M., Haydon, A.J. y Peacocke, A.R. (1970) Biochem. J. 120, 859.
- Needleman, S.B. y Wunsch, C.D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443.
- Nelson, P.P., Albrigh, S.C., Wiseman, J.M. y Garrard, W.T.

- (1979) J. Biol. Chem. 254, 11751.
- Noll, M. (1974) Nature 251, 249.
  - Noll, M. (1976) Cell 8, 349.
  - Noll, M. y Kornberg, R.D. (1977) J. Mol. Biol. 109, 393.
  - Ogawa, Y., Quagliarotti, G., Jordan, J., Taylor, C.W., Starbuck, W.C. y Busch, H. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4387.
  - Ohlenbusch, H.H., Olivera, B.M., Tuan, D. y Davidson, N. (1967) J. Mol. Biol. 25, 299.
  - Olins, A.D. y Olins, D.E. (1973) J. Cell. Biol. 59, 5250.
  - Olins, A.D. y Olins, D.E. (1974) Science 183, 330.
  - Olins, D.E. y Wright, E.B. (1973) J. Cell. Biol. 59, 304.
  - Olson, M.O.J., Jordan, J. y Busch, H. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 50.
  - Padros, E., Avilés, F.J., Albert, A. y Palau, J. (1978) Anales de Química 74, 1417.
  - Pages, M. y Alonso, C. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 549.
  - Palau, J., Ruiz-Carrillo, A. y Subirana, J.A. (1969) Eur. J. Biochem. 7, 209.
  - Panyim, S. y Chalkley, R. (1969) Archives Biochem. Biophys. 130, 337.
  - Panyim, S. y Chalkley, R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7557.
  - Pardon, J.F. y Wilkins, M.H. (1972) J. Mol. Biol. 68, 115.
  - Pardon, J.F., Wilkins, M.H. y Richards, B.M. (1967) Nature 215, 208.
  - Pflum, M.N. y Beychok, S. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3982.
  - Phillips, D.M.P. y Clarke, M. (1970) J. Chromatog. 46, 320.
  - Polacow, I. y Simpson, R.T. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 202.
  - Puigdomenech, P., Cabré, O., Palau, J., Bradbury, E.M. y Crane-Robinson, C. (1975) Eur. J. Biochem. 59, 237.

- Puigdomenech, P., Palau, J. y Crane-Robinson, C. (1980) Eur. J. Biochem. 104, 263.
- Rall, S.C. y Cole, R.D. (1971) J. Biol.Chem. 240, 7175.
- Rayner, D.M., Krajcarski, D.T. y Szabo, A. (1978) Can. J. Chem. 56, 1238.
- Reeck, G.R., Simpson, R.T. y Soler, H.A. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2317.
- Rendelhuber, T.L., Boulikas, T. y Garrard, T. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4511.
- Renz, M., Nehls, P. y Hozier, J.P. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1879.
- Richards, B.M. y Pardon, J.F. (1970) Exp. Cell. Res. 62, 184.
- Rill, R. y Van Holde, K.E. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1080.
- Sahasrabudde, C.G. y Van Holde, K.E. (1974) J. Biol. Chem. 249, 152.
- Sankoff, D. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 4.
- Sautiere, P., Tyron, D., Laine, B., Mizon, J., Ruffin, P. y Biserre, G. (1974) Eur. J. Biochem. 41, 563.
- Schaffner, W., Kunz, G., Daetwyler, H., Telford, J., Smith, H.O. y Birnstiel, M.L. (1978) Cell 14, 655.
- Scheer, U. (1978) Cell 13, 535.
- Schmitz, K.S. y Ramanathan, B. (1980) J. Theor. Biol. 83, 297.
- Sears, D.W. y Beychok, S. (1973) en Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Parte C, (Leach, S.S., Ed.), pag. 445, Academic Press, London.
- Sedat, J. y Manuelidis L. (1977) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Chromatin XLII, 331.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E. y Maizel, J.N. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815.
- Shaw, B.R., Herman, T.M., Kovacic, R.T., Beandreau, G.S. y Van Holde, K.E. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 505.

- Simpson, R.T. (1974a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2743.
- Simpson, R.T. (1974b) en Current Topics in Biochemistry (Anfinsen, C.B. y Schecter, A.N., Ed.), pag. 135, Academic Press, New York.
- Simpson, R.T. (1978) Biochemistry 17, 5525.
- Singer, D.S. y Singer, M.F. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 2531.
- Smerdon, M.J. e Isenberg, I. (1976) Biochemistry 15, 4233.
- Smith, B.J., Walker, J.M. y Johns, E.W. (1980) FEBS. Letters 112, 42.
- Solnner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1975) Biochemistry 9, 3103.
- Sokolovsky, M., Riordan, J.F. y Valleé, B.L. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 20.
- Sponar, J. y Fric, I. (1972) Biopolymers 11, 2317.
- Sponar, J. y Sormova, Z. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 99.
- Strickland, W.N., Schaller, H., Strickland, M. y Von Holt, C. (1976) FEBS Letters 66, 322.
- Strickland, W.N., Strickland, M., Groot, P.C., Von Holt, C. y Wittmann-Liebold, B. (1980a) Eur. J. Biochem. 104, 559.
- Strickland, W.N., Strickland, M. Brandt, W.F., Von Holt, C., Lehmann, A. y Wittmann-Liebold, B. (1980b) Eur. J. Biochem. 104, 567.
- Suau, P., Kneale, G.G., Braddock, G.W., Baldwin, J.P. y Bradbury, E.M. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 3769.
- Summers, M.R., Smythers, G.W. y Oroszlami, S. (1973) Anal. Biochem. 53, 264.
- Tancredi, T. y Temussi, P.A. (1979) Biopolymers 18, 1.
- Thoma, F., Koller, T.H. y Klug, A. (1979) J. Cell. Biol. 83, 403.
- Thomas, J.O. y Kornberg, R.D. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2626.
- Tood, R.D. y Garrard, W.T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4729.
- Tood, R.D. y Garrard, W.T. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3074.

- Van Holde, K.E. e Isenberg. I. (1975) Accounts Chem. Res. 8, 327.
- Van Holde, K.E., Sahasrabudhe, C.G. y Shaw, B. (1974) Nucleic Acids Res. 1, 1579.
- Varshavsky, A.J., Bakayev, U.V. y Georgiev, G.P. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 477.
- Vogel, T. y Singer, M.F. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2334.
- Vollenweider, H.J., Sogo, J.M., Koller, T.H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 83.
- Weintraub, H. y Graudine, M. (1976) Science 193, 848.
- Whitlock, J.P., Jr. y Simpson, R.T. (1976) Biochemistry 15, 3307.
- Wilkins, M.H. (1956) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21, 75.
- Wilkins, M.H., Zubay, G. y Wilson, . (1959) J. Mol. Biol. 1, 179.
- Williams, R.E. y Selgy, V.L. (1973) FEBS Letters 33, 1907.
- Witmann-Liebold, B., Geissler, A. W. y Marzinzig, R. (1975) J. Supramol. Struct. 3, 426.
- Yaguchi, M., Roy, C. y Seligy, V.L. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 1400.
- Yamada, S. e Itano, H.A. (1966) Biochim. Biophys. Acta 130, 538.
- Yeoman, L.C., Olson, W.O., Sugano, N., Jordan, J.J., Taylor, C.W., Starbuck, W.C. y Busch, H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6018.

